



THÈSE

Présentée par M^{me} **Sonia MEDOUNI-ADRAR**

Pour l'obtention du grade de **Docteur en Sciences**

Filière : Biologie

Spécialité : Contrôle de Qualité des Aliments, Certification et Méthodes de Validation

Thème

Le profil phénolique et activité antioxydante de quelques variétés de raisin de Bejaia : Etude comparative entre deux méthodes d'extraction

Soutenue le 15 Mai 2018

devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
M ^{me} Lila BOULEKBACHE	MCA	Université de Bejaia	Présidente
M ^r Khodir MADANI	Professeur	Université de Bejaia	Rapporteur
M ^{me} Sabrina HAMRI	MCA	Université de Bejaia	Examinatrice
M ^r Mohamed KEBIECHE	Professeur	Université de Batna	Examineur
M ^r Farid DAHMOUNE	MCA	Université de Bouira	Examineur
M ^r Omar AOUN	MCA	Université de Khemis Miliana	Examineur
M ^r Yves CADOT	Ingénieur de recherche	INRA Nantes-Angers France	Invité

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Dieu, le tout puissant et le miséricordieux, qui m'a donné le courage afin d'achever ce travail.

Mes premiers remerciements sont bien entendus pour le professeur **Khodir MADANI**, qui m'a guidé depuis mon ingéniorat (2004) jusqu'à la fin de cette thèse. Mon encadreur qui s'est beaucoup soucié de m'amener vers la réflexion en faveur de l'intégration des connaissances. Je le remercie d'avoir accepté de m'encadrer et m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce travail. Ses qualités humaines m'ont toujours permis de travailler sereinement. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération et ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier le docteur **Yves CADOT**, chercheur à l'NRA d'Angers en France, pour m'avoir accueilli chaleureusement à deux reprises dans son laboratoire. Je le remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du Jury : **M^{me} Lila BOULEKBACHE**, maître de conférences A à l'université de Bejaia, pour l'honneur qu'elle m'a fait d'accepter de présider le Jury et d'examiner ma thèse et pour ses nombreux conseils.

Je remercie aussi **M^{me} Sabrina HAMRI**, maître de conférences A à l'université de Bejaia, **M^r Mohamed KEBIECHE**, professeur à l'université de Batna, **M^r Farid DAHMOUNE**, maître de conférences A à l'université de Bouira, et **M^r Omar AOUN**, maître de conférences A au centre universitaire de Khmis Méliana, qui ont accepté d'évaluer ma thèse. C'est un honneur pour moi de vous avoir dans mon Jury et je vous remercie énormément pour l'intérêt que vous portez à ma thèse. Vos remarques et suggestions ne feront qu'améliorer la qualité de ce document.

Je remercie particulièrement **M^r F. Dahmoune** qui m'a aidé et initié dans l'étude des plans d'expériences.

Mes remerciements s'adressent également à **M^{me} Marie-Hélène BOUVET**, et à **M^{me} Anne MEGE** techniciennes au sein du laboratoire polyphénols de l'unité Vigne et Vin chercheur à l'INRA d'Angers en France qui m'ont aidé dans l'identification et la quantification des composés phénoliques par HPLC, ainsi que les différentes extractions et l'évaluation de l'activité antiradical ABTS et du pouvoir réducteur.

Je remercie également **M^r Javier PENONA** professeur au sein du département de Biotechnologie Alimentaire, institut d'expertise en matières grasses de Seville (Espagne) pour son accueil dans son laboratoire et ses conseils.

Merci à **M^{me} Lamia MEDOUNI**, doctorante au sein du laboratoire de microbiologie appliquée pour son aide si précieuse dans la réalisation des travaux pratiques, et pour sa sympathie.

Ma reconnaissance va également aux enseignants du département des Sciences Alimentaires : **M^{elle} A. MAKHOUKHE**, **M^{me} O. SOUFI**, **M^{me} N. GUENDOZ**, **M^{elle} F.BRAHMI**, **M^r M. BACHIR BEY** et **M^r H. BOUDERIES** pour leurs conseils. Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire de **3BS**.

Je remercie mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second. Il s'est toujours montré très compréhensif, et m'a beaucoup encouragé, aidé et soutenu durant les moments difficiles pendant la réalisation de ce travail.

Merci enfin pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre lors de mon travail.

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu le tout puissant est enfin achevé ce travail, lequel je dédie à
toutes les personnes qui me sont chères*

*A ceux qui ont mon cœur depuis sa naissance, qui n'ont éprouvé qu'amour et
reconnaissance*

*A ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne
de confiance*

A ceux qui m'ont soutenu nuits et jours, et durant tout mon parcours

A vous très chers parents je vous dis merci

A mon très cher mari qui m'a toujours soutenu et encouragé

A mon rayon de soleil, mon fils Manil

A mes sœurs (Radia et Lamia) et frères (Fahim et Locif)

A mes beaux parents

A mes belles sœurs et beaux frères

A mes neveux et nièces

A tous mes amis

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

I. Histoire de la vigne et de sa culture en Algérie	4
II. Classification Botanique des raisins	5
III. Description botanique et répartition géographique de la vigne et du raisin.....	5
IV. Morphologie et anatomie de la baie de raisin	6
IV.1. La pellicule.....	6
IV.2. La pulpe.....	7
IV.3. Les pépins	7
V. Composition et valeur nutritive du raisin	7
V.1. Glucides.....	7
V.2. Acides organiques	8
V.3. Matières minérales	8
V.4. Substances azotées	8
V.5. Matières pectiques.....	9
V.6. Substances odorantes.....	9
VI. Le marché économique des raisins	9
VI.1. Le marché mondial.....	9
VI.2. Le marché algérien.....	10
VII. Classification commerciale des cépages.....	11
VIII. Antioxydants des raisins	12
VIII.1. Caroténoïdes.....	13
VIII.2. Composés phénoliques	14
VIII.2.1. Composés flavonoïdes.....	15
VIII.2.1.1. Flavonols	15

VIII.2.1.2. Flavanols (flavan-3-ols)	15
VIII.2.1.3. Anthocyanes	17
VIII.2.2. Composés non-flavonoïdes	17
VIII.2.2.1. Acides phénoliques.....	17
VIII.2.2.2. Stilbènes	18
VIII.4. Modes d'action des polyphénols comme antioxydants	19
VIII.4.1. Chélation des métaux	19
VIII.4.2. Neutralisation des radicaux libres	20
VIII.4.3. Inhibition d'enzymes	20
IX. Techniques extractives des substances bioactives : les composés phénoliques.....	21
IX.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)	21
IX.2. Extraction assistée par microondes (EAM)	22

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I. Matériel végétal	26
II. Préparation des échantillons	26
III. Analyses physico-chimiques	26
III.1. Le taux d'humidité	26
III.2. Le pH et l'acidité.....	28
III.3. Le Brix.....	28
IV. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques	29
IV.1. Type du solvant d'extraction	29
IV.2. Préparation des extraits suivant la méthodologie des surfaces de réponses	29
IV.2.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)	29
IV.2.2. Extraction assistée par microondes (EAM)	30
V. Dosage des antioxydants	32
V.1. Dosage des composés phénoliques totaux.....	32
V.2. Anthocyanes	32
V.2.1. Extraction	32
V.2.2. Dosage	32
V.3. Vitamine C	33
V.4. Caroténoïdes.....	33
VI. Profils phénoliques.....	33

VI.1. Analyse des acides phénols, flavonols et anthocyanes par HPLC	33
VI.2. Analyse des tanins condensés par HPLC	34
VI.2.1. Fractionnement des tanins	34
VI.2.2. Thiolyse	35
VI.2.3. Analyse par HPLC	36
VII. Evaluation du pouvoir antioxydant	37
VII.1. Pouvoir antiradicalaire DPPH*	37
VII.2. Pouvoir antiradicalaire ABTS**	37
VII.3 Pouvoir réducteur	38
VII.4. Pouvoir chélateur du fer	38
VIII. Analyses statistiques	39

II. Résultats et discussion

Chapitre I : Caractérisation physico-chimiques des raisins

I. Taux d'humidité	40
II. pH et acidité	41
III. Acidité titrable	42
IV. Degré Brix	43
V. Indice de maturité	43

Chapitre II : Optimisation de l'extraction des composés phénoliques

I. Sélection de la nature du solvant	45
II. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par la méthodologie des surfaces de réponses	48
II.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)	49
II.1.1. Construction du plan expérimental	49
II.1.2. Validation des modèles	50
II.1.3. Effet des facteurs	52
II.1.4. Représentations spatiales et analyse des surfaces de réponses	54
II.1.5. Détermination des conditions optimales	58
II.2. Extraction Assistée par Microondes (EAM)	59
II.2.1. Construction du plan expérimental	59
II.2.2. Validation des modèles	61
II.2.3. Effet des facteurs	61

II.2.4. Représentation spatiale et analyse des surfaces de réponse	63
II.2.5. Détermination des conditions optimales.....	66

Chapitre III : Dosage des antioxydants

I. Composés phénoliques totaux.....	67
I.1. Composés phénoliques totaux des pépins.....	67
I.2. Composés phénoliques totaux des pellicules.....	69
I.3. Composés phénoliques totaux des pulpes.....	71
II. Anthocyanes	74
II.1. Sélection du solvant approprié	74
II.2. La concentration du solvant.....	75
III. Caroténoïdes.....	76
IV. Vitamine C	78

Chapitre IV : Profils phénoliques

I. Acides phénols	80
I.1. Acides phénols de la pellicule.....	80
I.2. Acides phénols de la pulpe	84
II. Flavonols	90
II.1. Flavonols de la pellicule	90
II.2. Flavonols de la pulpe.....	97
III. Tanins	100
III.1. Tanins des pellicules	100
III.2. Tanins des pépins	107
III.2. Tanins des pulpes	114
III.4. Comparaison de l'effet des deux méthodes d'extraction sur les tanins des différentes matrices étudiées (pépins, pellicule et la pulpe).....	120
VI. Anthocyanes.....	121

Chapitre V : Activité antioxydante

I. Pouvoir réducteur du fer	129
I.1. Pouvoir réducteur des pépins	129
I.2. Pouvoir réducteur des pellicules	131

I.3. Pouvoir réducteur des pulpes	132
II. Pouvoir anti-radical DPPH [•]	133
II.1. Pouvoir anti-radical DPPH [•] des pépins	133
II.2. Pouvoir anti-radical DPPH [•] des pellicules	135
II.3. Pouvoir anti-radical DPPH [•] des pulpes	136
III. Pouvoir anti-radical ABTS ^{•+}	138
III.1. Pouvoir anti-radical ABTS ^{•+} des pépins.....	138
III.2. Pouvoir anti-radical ABTS ^{•+} des pellicules.....	139
III.3. Pouvoir anti-radical ABTS ^{•+} des pulpes.....	141
IV. Pouvoir de chélation du fer	142
IV.1. Pouvoir de chélation du fer des pépins	142
IV.2. Pouvoir de chélation du fer des pellicules	143
IV.3. Pouvoir de chélation du fer des pulpes	144
V. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante	146
V.1. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pépins	146
V.2. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pellicules	148
V.3. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pulpes	151
Conclusion.....	154
Références bibliographiques	159
Annexes	

Liste des abréviations

- A. Bou-Amar** : Ahmar Bou-Amar.
- AB**: Ahmar Bou-Amar
- ABTS^{•+}** : 2,2'azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- BHA** : butylhydroxyanisole.
- DPm** : Degré de Polymérisation moyen.
- DPPH[•]** : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- DSA** : Direction des Services Agricoles
- EAA** : Equivalent Acide Ascorbique.
- EAC** : Equivalent Acide Caftarique
- EAG** : Equivalent Acide Gallique
- EAM** : Extraction assistée par microondes
- EC** : Equivalent Catéchine.
- ECG**: Epicatéchine-3-O-gallate.
- ECS** : Extraction conventionnelle par solvant
- EEC** : Equivalent EpiCatéchine
- EGC**: Epigallocatechine.
- EI** : Etalon Interne
- EMC** : Extraction par macération conventionnelle
- EMv** : Equivalent Malvidine 3-glucoside
- EMv3G** : Equivalent 3-glucoside de Malvidol
- EQ3G** : Equivalent 3-glucoside de Quercétol
- ET** : Equivalent Trolox
- EβC** : Equivalent de β-Carotène.
- FAO** : Food Agricultural organisation
- FRAP**: Ferric Reducing Ability of Plasma.
- HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance
- IC₅₀** : Concentration Inhibitrice de 50% du radical DPPH[•].
- IT**: Italia
- ITAF** : Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la vigne.
- MeOH** : Méthanol
- MF** : Matière Fraîche
- mha**: Milliers d'hectares
- Mio ha**: Millions d'hectares

Mio t: Millions de tonnes

MS : Matière Sèche.

OIV : Organisation Internationale de la Vigne et du vin

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PT : Polyphénols Totaux

TFA : Acide TriFluoro-acétique.

TR : Temps de rétention.

Trolox : 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Représentation schématique d'une baie de raisin.	6
2	Superficie viticole mondiale en 2016.	10
3	Présentation graphique de la production de raisin au niveau des différentes communes de la wilaya de Bejaia.	11
4	Présentation graphique des cépages cultivés à la wilaya de Bejaia.	11
5	Représentation schématique du lycopène, caroténoïde linéaire. Par cyclisation des extrémités, on obtient la structure du β -carotène	14
6	Structure des flavonols.	15
7	Structure des tanins de raisin.	16
8	Structure des anthocyanes de raisin.	17
9	Structures des acides phénoliques.	18
10	Structure de différentes formes du resvératrol	19
11	Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes.	20
12	Représentation graphique d'un champ électrique.	22
13	Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques.	23
14	Fractionnement d'un trimère par thiolysé.	36
15	Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour les composés phénoliques des extraits de pépins (a), de la pellicule (b) et de la pulpe (c), obtenus par EMC.	52
16	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses des effets de la concentration du solvant et du temps d'extraction (a : pépins. b : pellicule, c : pulpe), de la concentration du solvant et du rapport échantillon/solvant (a' : pépins, b' : pellicule, c' : pulpe) et du temps d'extraction et du rapport échantillon/solvant (a'' :pépins, b'' : pellicule, c'' : pulpe) sur l'extraction des composés phénoliques des différentes parties de la baie de raisin du cépage <i>Ahmar Bou-Amar</i> .	56
17	Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour les composés phénoliques des extraits de pépins (a), de la pellicule (b) et de la pulpe (c), obtenus par EAM.	63
18	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses des effets de la puissance d'irradiation et du temps d'extraction (a : pépins ; b : pellicule ; c : pulpe), sur l'extraction des composés phénoliques par EAM des différentes parties de la baie de raisin du cépage <i>Ahmar Bou-Amar</i> .	64

19	Teneurs en composés phénoliques totaux des pépins de raisins étudiés	67
20	Teneurs en composés phénoliques totaux des pellicules de raisins étudiés	70
21	Teneurs en composés phénoliques totaux des pulpes de raisins étudiés	71
22	Effet du type du solvant sur l'extraction des anthocyanes de la pellicule des raisins rouge étudiés.	74
23	Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des anthocyanes des pellicules de raisins rouge étudiés.	75
24	Teneurs en Vitamine C des différents jus de raisins étudiés.	79
25	Chromatogramme obtenu à 320 nm pour l'extrait de la pellicule du cépage <i>Cardinal</i> .	80
26	Teneurs en acides phénols totaux des pellicules de raisins.	83
27	Chromatogrammes obtenus à 320 nm pour les extraits de pulpe des cépages <i>Ahmar Bou-Amar</i> (a), <i>Italia</i> (b) et <i>Dattier</i> (b).	85
28	Teneurs en acides phénols totaux des pulpes de raisins.	89
29	Chromatogrammes obtenus à 360 nm pour les extraits de pulpe des cépages <i>Dattier</i> (a), <i>Cardinal</i> (b) et <i>Muscat Noir</i> (c).	92
30	Teneurs en flavonols totaux des pellicules de raisins.	96
31	Chromatogramme obtenu à 360 nm pour l'extrait de la pulpe du cépage <i>Dattier</i> .	97
32	Teneurs en flavonols totaux des pulpes de raisins.	99
33	Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits de la pellicule du cépage <i>Italia</i> avec tiolyse (a) et sans tiolyse (b).	100
34	Teneurs en tanins totaux des pellicules de raisins.	102
35	Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits des pépins du cépage <i>Italia</i> avec thiolyse (a) et sans thiolyse (b).	109
36	Teneurs en tanins totaux des pépins de raisins.	110
37	Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits de la pulpe du cépage <i>Italia</i> obtenus par EAM (a) et EMC (b).	114
38	Teneurs en tanins totaux des pulpes de raisins.	115
39	Chromatogrammes obtenus à 520 nm pour les extraits anthocyaniques des cépages <i>Muscat Noir</i> (a), <i>Ahmar Bou-Amar</i> (b) et <i>Cardinal</i> (c).	122
40	Dégradation d'une anthocyane monoglycoside par la chaleur	128
41	Pouvoir réducteur des pépins.	130
42	Pouvoir réducteur des pellicules	131

43	Pouvoir réducteur des pulpes.	132
44	Activité antiradicalaire DPPH [•] des pépins.	134
45	Activité antiradicalaire DPPH [•] des pellicules.	136
46	Activité antiradicalaire DPPH [•] des pulpes	137
47	Activité antiradicalaire ABTS ^{•+} des pépins.	139
48	Activité antiradicalaire ABTS ^{•+} des pellicules	140
49	: Activité anti-radical ABTS ^{•+} des pulpes.	141
50	Activité chélatrice du fer des pépins.	143
51	Activité chélatrice du fer des pellicules.	144
52	Activité chélatrice du fer des pulpes.	145

Liste des tableaux

I	Composition en minéraux des différentes fractions de la baie de raisin (mg/g de cendres).	8
II	Valeurs de constante diélectrique (ϵ') obtenues à 20°C pour les solvants les plus communément utilisés en EAM.	24
III	Caractéristiques morphologiques des raisins étudiés.	27
IV	Différentes conditions de préparation des extraits des trois fractions étudiées avec EMC suivant la méthodologie des surfaces de réponses	30
V	Les différents niveaux appliqués pour les paramètres de l'EMC selon la fraction végétale étudiée.	30
VI	Différentes conditions de préparation des extraits des trois fractions étudiées avec EAM suivant la méthodologie des surfaces de réponses	31
VII	Les différents niveaux appliqués pour les paramètres de l'EAM selon la fraction végétale étudiée.	32
VIII	Gradient linéaire utilisé pour la séparation des anthocyanes, des flavonols et des acides phénols	34
IX	Gradient linéaire utilisé pour la séparation des flavan-3-ols.	37
X	Teneurs en humidité des différentes parties de la baie des raisins étudiés (%)	40
XI	Caractéristiques physico-chimiques des jus des raisins étudiés	42
XII	Effet de la nature du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux à partir des extraits de pépins, pellicule et pulpe de raisin de deux cépages.	46
XIII	Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues pour la technique d'EMC.	51
XIV	Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) dans le cas d'EMC.	53
XV	Présentation des paramètres optimisés d'EMC.	58
XVI	Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues pour la technique d'EAM.	60
XVII	Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) dans le cas d'EAM.	62
XVIII	Présentation des paramètres optimisés d'EAM.	66
XIX	Teneurs en caroténoïdes des différentes parties de la baie du raisin.	77
XX	Les acides phénols détectés dans les pellicules des raisins étudiés et leurs concentrations exprimées en mg EAC/Kg MS.	81
XXI	Les acides phénols individuels détectés dans les extraits de pulpes des	86

	raisins étudiés (mg EAC/Kg MF) obtenus par les deux méthodes d'extraction.	
XXII	Les flavonols individuels détectés dans les extraits de pellicules des raisins étudiés (mg EQ3G/Kg MS).	93
XXIII	Les flavonols individuels détectés dans les extraits de pulpes des raisins étudiés (mg EC3G/Kg MF).	98
XXIV	Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pellicules des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).	103
XXV	Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPm) des pellicules des cépages étudiés.	105
XXVI	Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pépins des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).	111
XXVII	Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPm) des pépins des cépages étudiés.	112
XXVIII	Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pulpes des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).	117
XXIX	Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPm) des pulpes des cépages étudiés.	119
XXX	Les anthocyanes détectées dans les extraits des pellicules des raisins rouges étudiés (mg EMv3G/Kg MS).	124
XXXI	Proportions des différentes fractions d'anthocyanes détectées dans les pellicules des raisins rouges étudiés (%).	126
XXXII	Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pépins.	147
XXXIII	Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pellicules.	149
XXXIX	Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pulpes.	152

Introduction

Introduction

Symbole, comme l'olivier, du paysage et de la civilisation méditerranéenne, la vigne est partie à la conquête du monde, elle est implantée partout où elle trouvait le climat physique et humain propice à son développement (Tayeb, 1990).

Les caractéristiques essentielles des vignobles de l'Algérie résultent d'une longue histoire (Levadoux *et al.*, 1971 ; Tayeb, 1990). Depuis très longtemps, la vigne a constitué un élément naturel du paysage botanique de l'Algérie ; le sol algérien portait des vignes sauvages appartenant à l'espèce commune *Vitis vinifera*. Les forêts des massifs de l'Atlas en conservent encore de nombreux vestiges que l'on voit enlacer les grands arbres des forêts (Levadoux *et al.*, 1971 ; ITAF, 2011).

Une introduction de formes cultivées plus productives a été faite par les différents conquérants de l'Afrique du Nord et qui se seraient croisées avec des formes autochtones aboutissant à des cépages parfaitement acclimatés aux conditions du milieu qui s'approchent de l'idéal pour la vigne (Levadoux *et al.*, 1971 ; ITAF, 2011). Cet héritage a engendré une grande richesse dans l'encépagement de la viticulture algérienne (Fodil, 1989).

Le raisin de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*), est l'un des fruits les plus consommés au monde, qu'il soit transformé (vin, jus ou raisins secs) ou sous sa forme naturelle (raisins de table) (Lago-Vanzela *et al.*, 2011a), avec 75,8 millions de tonnes produites en 2016 (OIV, 2017). La production algérienne est estimée à 518035 tonnes en 2014 avec une superficie de 66417 ha (FAO, 2017), qui reste relativement faible en dépit de la surface importante non exploitée.

Le raisin est depuis longtemps réputé pour son action favorable sur la santé, grâce à son contenu en vitamines, acides organiques, minéraux et sucres facilement assimilables (Bunea *et al.*, 2012). Plusieurs études épidémiologiques et cliniques confirment le rôle incontestable de la consommation de raisins dans la réduction du risque des cancers et des maladies chroniques, notamment les affections cardiovasculaires; cette relation est souvent attribuée aux antioxydants présents dans ces fruits en particulier les polyphénols qui préviennent l'oxydation des molécules biologiques (Guendez *et al.*, 2005 ; Lago-Vanzela *et al.*, 2011a ; Lutz *et al.*, 2011).

De nombreux travaux sont menés dans le monde pour déterminer les propriétés physico-chimiques, la composition phénolique et la capacité antioxydante de différentes variétés de raisin, en particulier sous sa forme du vin. A notre connaissance, en Algérie, peu d'études ont été effectuées sur l'identification des composés phénoliques (acides phénols, flavonols, tanins et anthocyanes), sur le pouvoir antioxydant, ainsi que sur les propriétés physico-chimiques. Il s'avère important et nécessaire de mener une étude afin de définir les potentiels phénolique et antioxydant et les caractéristiques physico-chimiques des variétés cultivées dans notre pays pour valoriser le patrimoine viticole national.

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes (Afoakwah *et al.*, 2012; Dragovic'-Uzelac *et al.*, 2012 ; Baghdikian *et al.*, 2016). Diverses techniques ont été développées à cet égard. Les méthodes d'extraction conventionnelles telle que la macération (Dragovic'-Uzelac *et al.*, 2012; Ravalji *et al.*, 2012) et des méthodes d'extraction non conventionnelles, basées sur de nouvelles technologies d'extraction telle que l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) (Afoakwah *et al.*, 2012; Rafiee *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011; Wong-Paz *et al.*, 2014), mais peu de travaux ont été réalisés sur l'impact de la méthode d'extraction, particulièrement EAM, sur la stabilité des composés phénoliques individuels des matrices végétales, particulièrement celle des raisins. Par ailleurs, vu la complexité et la variabilité des compositions et des propriétés des différentes matrices végétales, un protocole universel d'extraction de ces substances n'existe pas, d'où la nécessité d'une étape d'optimisation. L'optimisation d'extraction des antioxydants s'opère par la méthode du plan d'expérience qui traite plusieurs facteurs à la fois et met en évidence les différentes interactions possibles entre les paramètres.

Ainsi, les objectifs de notre travail sont :

(1) L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques totaux à partir de trois parties de la baie de raisin par deux méthodes d'extraction (EMC et EAM), tout en appliquant une méthode statistique appropriée (méthodologie de surfaces de réponses ; MRS).

(2) La détermination des potentiels qualitatif et quantitatif des composés phénoliques totaux et individuels des trois parties des baies (pépins, pellicules et pulpes) de six cépages de raisins de table (*Cardinal, Muscat Noir, Dattier, Muscat Blanc, Ahmar Bou-Amar et Italia*) cultivés dans la

région de Bejaia (Algérie), de leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs antioxydants ainsi que leurs activités antioxydantes.

(3) L'étude comparative entre deux méthodes d'extraction (EMC et EAM) des composés phénoliques totaux et individuels (simples) ainsi que vis-à-vis leurs activités antioxydantes.

Afin de réaliser ces objectifs, le présent travail est divisé en deux parties :

❖ La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui décrit la vigne et le raisin, l'histoire de la vigne et de la viticulture algérienne, le constat sur la production mondiale et locale, la composition antioxydante et les méthodes d'extraction des composés phénoliques.

❖ La deuxième partie, réservée à l'étude expérimentale, est scindée en matériel et méthodes, où les différentes procédures expérimentales sont décrites, et en résultats et discussion qui est répartis en cinq chapitres. Le premier chapitre traite les propriétés physico-chimiques des raisins. Le deuxième chapitre traite de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques. Les troisième et quatrième chapitres traitent de l'étude de la composition en substances bioactives et les profils phénoliques, respectivement et enfin, le cinquième chapitre traite de l'étude de l'activité antioxydante.

*Synthèse
Bibliographique*

Synthèse bibliographique

I. Histoire de la vigne et de sa culture en Algérie

L'histoire de la vigne accompagne depuis longtemps celle de l'Homme. La transformation graduelle de la vigne sauvage en vigne cultivée s'est probablement réalisée à partir du septième millénaire avant l'ère chrétienne. À partir de la Géorgie, la culture de la vigne se serait répandue dans tous les pays tempérés depuis l'Inde jusqu'à l'Occident Européen. Les premières fresques représentant des procédés de vinification ont été retrouvées en Égypte dans des lieux de sépulture datant de 3000 ans avant JC. La Grèce, en partie grâce à ses contacts avec l'Égypte, adopta la culture de la vigne, la vinification et le commerce du vin (vers 2000 ans avant JC). Les Grecs, au cours de leurs nombreux voyages, implantèrent la vigne dans tout le bassin méditerranéen et louèrent les bienfaits du vin sous le culte du dieu Dionysos (Reynier, 1986 ; Chauvet et Reynier, 1979). La grappe de raisin figure sur des monnaies à légende néopunique de Gunugu (aujourd'hui Gouraya, petite ville côtière à l'Ouest d'Alger) représentant une tête de Dionysos accompagné d'une grappe de raisin (Tayeb, 1990).

La vigne est une plante spécifiquement méditerranéenne. Elle s'épanouit pleinement sur les rives de la mer méditerranée. La viticulture en Algérie remonte à l'Antiquité et particulièrement à la colonisation romaine puisqu'elle a trouvé les conditions agro-climatiques idéales pour son développement (Levadoux *et al.*, 1971). Depuis les temps reculés, l'Afrique du Nord produisait des vins qu'elle exportait vers les territoires bordant la méditerranée. Les témoignages concordent sur ce point. De petites amphores de terre cuite ayant contenu des traces de vin furent retrouvées, datant de 3.000 à 4.000 ans avant JC. Il est bien évident, comme le prouvent l'archéologie et les vieux auteurs, que la vigne était cultivée couramment dans les pays qui forment aujourd'hui la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (Tayeb, 1990).

Cinq siècles avant l'ère chrétienne, les vins de la colline de Byrsa à Carthage étaient déjà célèbres. Des traces certaines de cet ancien vignoble nord-africain ont été trouvées en Algérie, notamment dans les ruines de Cherchell et de Tipaza, où des mosaïques antiques représentent le déchaussage et le sarclage de la vigne, le foulage du raisin (Soler, 1954).

Dans la période qui suit la chute de l'Empire Romain, la viticulture a régressé progressivement au point de presque disparaître. Après la conquête de l'Afrique du Nord par les

Musulmans, auxquels le coran interdit la consommation du vin, les populations indigènes ne s'intéressent plus à la vigne que pour la production du raisin frais, qu'elles apprécient particulièrement (Soler, 1954).

Durant la période de la colonisation française, la viticulture algérienne a connu un très fort développement de vignes de cuve, pour des raisons agro-économiques, grâce aux conditions extrêmement favorables du milieu. Mais la viticulture de table n'y était l'objet d'aucune sollicitude particulière (Levadoux *et al.*, 1971 ; Fodil, 1989).

Depuis l'indépendance, le secteur vinicole est entré dans une phase négative en réduisant la production et la superficie. La viticulture a connu dans les années 80 une forte régression qui s'est traduite non seulement par la faiblesse des programmes de plantations, mais également à l'arrachage systématique de milliers d'hectares de vignes (Tayeb, 1990).

La tendance actuelle est d'augmenter et de valoriser la production à travers le financement partiel du plan relatif aux nouvelles installations et l'amélioration de la productivité et de la qualité des vignobles. Un intérêt particulier sur la production du raisin de table et du raisin sec est depuis porté (ITAF, 2011).

II. Classification Botanique des raisins

La vigne est classée dans l'ordre botanique des Rhamnales, elle appartient à la famille des vitacées, anciennement connue sous le nom ampélidacées, qui comprend un millier d'espèces (Huglin, 1986). Cette famille comprend 14 genres (Reynier, 1986 ; Chauvet et Reynier, 1979), parmi lesquels le genre *Vitis* qui se divise lui-même en deux sous-genres (Reynier, 1986 ; Zhou et Raffoul, 2012), *Muscadinia* qui possède $2n= 40$ chromosomes et *Euvitis* à $2n= 38$ chromosomes. La quasi-totalité des vignes cultivées fait partie de ce dernier (Huglin, 1986). Environ 30 espèces sont dénombrées dans le genre *Euvitis* (Reynier, 1986) et *Vitis vinifera* est l'espèce la plus cultivée (Zhou et Raffoul, 2012).

III. Description botanique et répartition géographique de la vigne et du raisin

La vigne est une espèce ligneuse, grimpante et pérenne, qui peut se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage (Chauvet et Reynier, 1979 ; Gary, 2003). Elle est cultivée pour ses fruits, les baies de raisins, utilisés pour la production du vin (raisins de cuve), de raisins de table et de raisins secs (Gary, 2003).

Le raisin est le fruit de la vigne cultivée, classé dans le groupe des fruits «charnus à pépins» (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975). Il se présente sous la forme de grappes constituées d'une

charpente ramifiée, la rafle, qui porte les grains, qui sont, sur le plan botanique, des baies de petites tailles (Chira *et al.*, 2008). Selon les cépages, le poids moyen d'une grappe varie de 60 à 400 g et la baie à un diamètre compris entre 5 et 30 mm (Mazoyer *et al.*, 2002). Le raisin est un fruit non-climactérique, il ne mûrit plus après la récolte (Kader, 1992).

Parmi toutes les plantes cultivées, la vigne est l'une de celles qui s'adaptent le mieux aux conditions les plus diverses. La vigne se trouve dans des zones très chaudes (Sahara) comme dans des zones fraîches et il n'y a que les climats excessifs qui empêchent sa culture. Outre la large possibilité d'adaptation au climat, on la trouve dans des sols acides, sols alcalins, terrains riches en argile comme dans le sable pur et ceci grâce au très grand choix de cépages et de porte-greffe qui la compose (Fodil, 1989).

IV. Morphologie et anatomie de la baie de raisin

La baie est un fruit charnu de forme arrondie plus ou moins allongée en fonction des variétés. Elle est composée de trois tissus majeurs - la pulpe, la pellicule et les pépins - ainsi que de faisceaux conducteurs qui l'alimentent en eau (fig.1) (Kennedy *et al.*, 2001 ; Conde *et al.*, 2007).

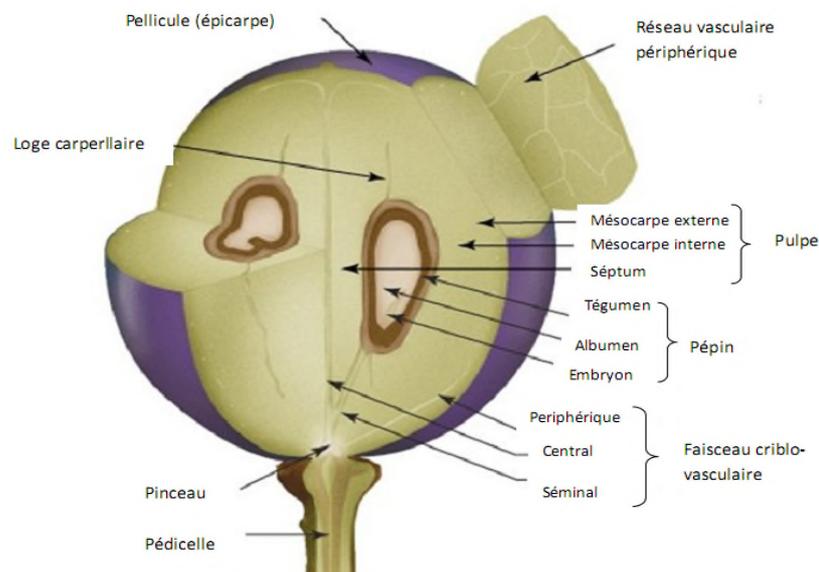


Figure 1 : Représentation schématique d'une baie de raisin (Kennedy, 2002).

IV.1. La pellicule

La pellicule ou épicarpe, aussi appelé, exocarpe, est la partie la plus externe de la baie, elle représente 5 à 18% du poids total de la baie et constitue la barrière entre le milieu extérieur et l'intérieur de celle-ci. Elle est également le lieu de synthèse et d'accumulation d'une majorité des composés d'intérêt œnologique (Kennedy, 2002). La pellicule est composée de 6 à 10 assises

cellulaires formant trois couches : la cuticule, l'épiderme et l'hypoderme. La cuticule est formée de cires lipidiques qui contribuent à limiter les pertes d'eau (Riederer et Schreiber, 2001). L'épiderme est constitué de 8 à 10 couches de cellules isodiamétriques de 6,5 à 10 µm de largeur. L'hypoderme est composé de 10 à 12 couches de cellules de 100 à 250µm de largeur, renferme les granulations de matières colorantes et odorantes (Navarre, 1988 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 ; Cadot *et al.*, 2008).

IV.2. La pulpe

La pulpe ou le mésocarpe est un tissu parenchymateux. Il est constitué de 25 à 30 couches de cellules, organisées en trois assises distinctes, celles-ci s'agrandissent pour atteindre une taille de 400 µm à la fin du stade de maturation (Carbonneau *et al.*, 2007). Les vacuoles des cellules sont remplies d'une solution aqueuse de sucre, de matières azotées et pectiques, d'acides organiques et de matières minérales. La pulpe représente la fraction la plus importante du raisin avec 80 à 85% du poids frais d'une baie de raisin (Navarre et Navarre, 1986 ; Navarre, 1988). Tout l'intérieur de la cellule est occupé par le mout, qui représente la quasi-totalité du poids de la pulpe. Le mésocarpe inclut aussi un endocarpe, fine couche de cellules délimitant les loges carpellaires qui contiennent les pépins (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

IV.3. Les pépins

Les pépins sont constitués d'un tégument dur et d'un albumen, ils sont riches en huiles et en polyphénols. Ils représentent 0 à 6 % du poids total du raisin. La baie de raisin devrait normalement contenir quatre pépins, dérivés des quatre ovules qui existent dans l'ovaire, mais presque toujours les pépins sont en nombre inférieur, généralement un seul. L'apyrénie ou absence de pépin, est recherché pour les raisins de table ou la préparation de raisin sec (Huglin, 1986 ; Navarre et Navarre, 1986 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

V. Composition et valeur nutritive du raisin

En plus de son rôle énergétique, grâce à sa richesse en sucres, le raisin renferme aussi d'autres composés comme les terpènes, les flavones, les aldéhydes, les anthocyanes (responsables de la couleur) et les tanins (Conde *et al.*, 2007). Les teneurs des composantes principales sont mentionnées dans le tableau I en annexe.

V.1. Glucides

Les sucres de raisin sont constitués de glucose et de fructose. À la maturité ces deux sucres sont en quantités sensiblement égale. Le saccharose n'est présent dans le raisin vert ou mur qu'à l'état de traces : 1 à 3 g/l. D'autres sucres ont été identifiés dans les raisins : l'arabinose, xylose,

rhamnose, maltose, raffinose. Les teneurs en sucres réducteurs de raisins murs varient de 150 à 300 g/l (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 ; Navarre, 1988).

V.2. Acides organiques

L'acide malique et l'acide tartrique représentent plus de 90% de la teneur en acides organiques contenus dans la baie (Huglin, 1986 ; Navarre et Navarre, 1986 ; Navarre, 1988). La proportion des autres acides éventuellement présents est relativement faible, mais ils sont nombreux : acides ascorbique, α -cétoglutarique, fumarique, galacturonique, glycérique, glycolique, glycuronique, glyoxylique, mandélique, oxalique, oxaloacétique, pyruvique, quinique, shikimique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

V.3. Matières minérales

Le potassium est l'élément principal représentant les matières minérales, vient ensuite le calcium puis le magnésium (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 ; Navarre, 1988 ; Conde *et al.*, 2007). Le tableau I donne pour la pellicule, les pépins et la pulpe des exemples de constitution des matières minérales relevées dans la littérature (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

Tableau I : Composition en minéraux des différentes fractions de la baie de raisin (mg/g de cendres) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

Matières minérales	Pellicule	Pépin	Pulpe
K	360	230	480
Na	14	10	24
Ca	150	228	52
Mg	30	51	34
Fe	6	3	2

V.4. Substances azotées

L'azote de la pulpe ne représente que le quart, voire le cinquième de l'azote total de la baie. Les matières azotées se rencontrent dans le mout sous forme ammoniacale et sous forme organique, constituée d'acides aminés, de polypeptides et de protéines (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). 60% des composés azotés des baies sont représentés par les acides aminés. Les principaux

sont la proline et l'arginine, bien que d'autres acides aminés soient présents (Navarre et Navarre, 1986 ; Navarre, 1988).

V.5. Matières pectiques

Les matières pectiques extraites de la membrane cellulosopectique, qui constituent le ciment intercellulaire, sont un mélange de pectines et de gommes pentosanes.

La pectine pure est constituée par une chaîne de noyaux polygalacturoniques, encore appelés acide pectique, plus ou moins estérifiés par le méthanol. On distingue la pectine soluble qui se trouve dans le moût et la pectine insoluble ou protopectine qui reste fixée à la partie solide du raisin.

Les gommes sont des osanes, anhydrides de sucres polymérisés. Les gommes du raisin sont généralement des arabanes anhydrides d'arabinose, et parfois des galactanes. Le raisin renferme généralement plus de gommes que de pectines (Navarre et Navarre, 1986 ; Navarre, 1988 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

V.6. Substances odorantes

Les essences odorantes caractéristiques des différents cépages sont localisées essentiellement dans la pellicule. Elles existent probablement aussi dans la pulpe, mais en faible quantité (Navarre, 1988). Parmi les constituants volatils du raisin, des alcools et aldéhydes en C₆ : hexanol-2 ol-1, hexanal et hexène-2 ol (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975).

VI. Le marché économique des raisins

VI.1. Le marché mondial

Le raisin de table est le troisième fruit le plus consommé au monde derrière les bananes et les pommes (OIV, 2017 ; Statista, 2017).

Le taille du vignoble mondial (quelle que soit la destination finale des raisins et y compris les vignes non encore en production) en 2016 s'élève à 7,5 millions d'hectares, dont cinq pays représentent 50% du vignoble mondial (fig.2). La superficie viticole chinoise poursuit sa progression (847 mha), confirmant ainsi sa place de 2^{ème} vignoble mondial. L'Espagne reste largement en tête pour les surfaces cultivées avec presque un million d'hectares (0,98 Mio ha) devant la Chine (0,85 Mio ha) et la France (0,79 Mio ha) (OIV, 2017).

En 2016, la production mondiale de raisins (raisins destinés à tous types d'utilisation) est de 75,8 millions de tonnes. La tendance de la production de raisins depuis 2000 est à la hausse (+17%), malgré la diminution de la superficie du vignoble : ceci s'explique principalement par

une hausse des rendements, ainsi que pour l'amélioration continue des techniques viticoles (OIV, 2017).

La Chine est le premier producteur de raisin avec 14,6 millions de tonnes en 2016 (19 % de la production mondiale de raisin), suivie de l'Italie (7,9 Mio t), des États-Unis (7,1 Mio t), et de la France (6,4 Mio t) (OIV, 2017).

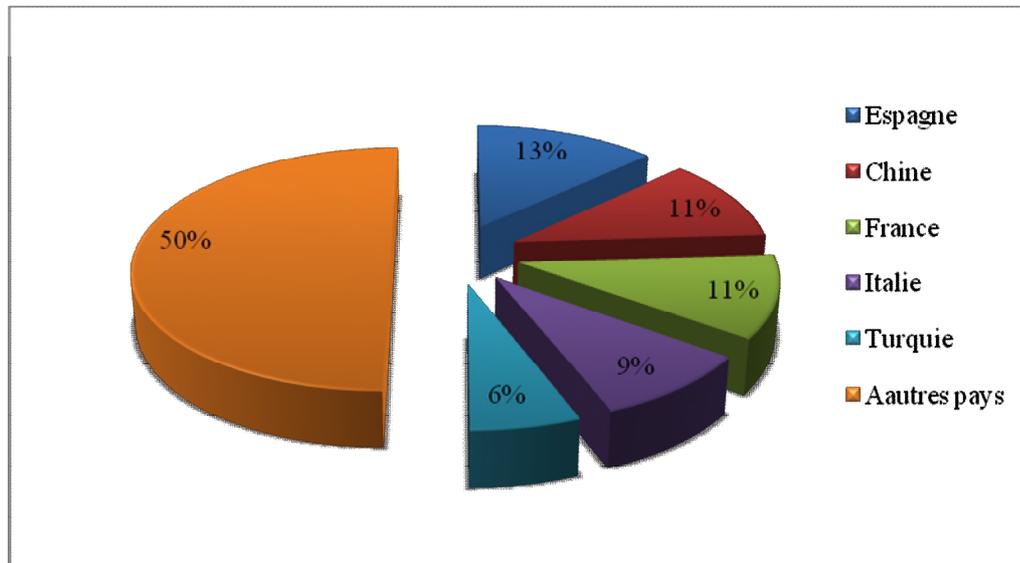


Figure 2 : Superficie viticole mondiale en 2016 (OIV, 2017).

VI.2. Le marché algérien

La viticulture algérienne a connu des fluctuations importantes durant les derniers siècles. Durant la colonisation française, elle est caractérisée par un très fort développement dans la production de raisins de cuve (1854000 tonnes produites en 1961) (FAO, 2017), pour faire de notre pays le 4^{ème} pays producteur de vin et le premier exportateur.

Cependant, notre pays a connu une phase de régression pendant les années 80 durant lesquelles les vignes de cuve ont été arrachées volontairement pour être remplacées par des vignes de table, passant d'une superficie viticole de 345714 ha (1965) à 105640ha (1989) avec des productions respectivement, de 1902000 et 270426 tonnes selon FAO (2017).

Pendant les deux dernières décennies, des progressions dans la production de raisins de table ont été enregistrées, passant de 141294 (1995) à 518035 (2014) tonnes (FAO, 2017).

En Algérie, la culture des raisins vient en 12^{ième} position après les olives (FAO, 2017). Selon le ministère de l'Agriculture, la wilaya de Bejaia vient en 14^{ième} position à l'échelle nationale

avec une production de 277 71 quintaux pour la campagne viticole 2011/2012. La commune d'Amizour se retrouve en tête avec une production de 151 90 quintaux, suivi des communes de Bejaia et de Timezrit qui produisent 1765 et 1600 quintaux, respectivement (fig. 3) (DSA, 2012).

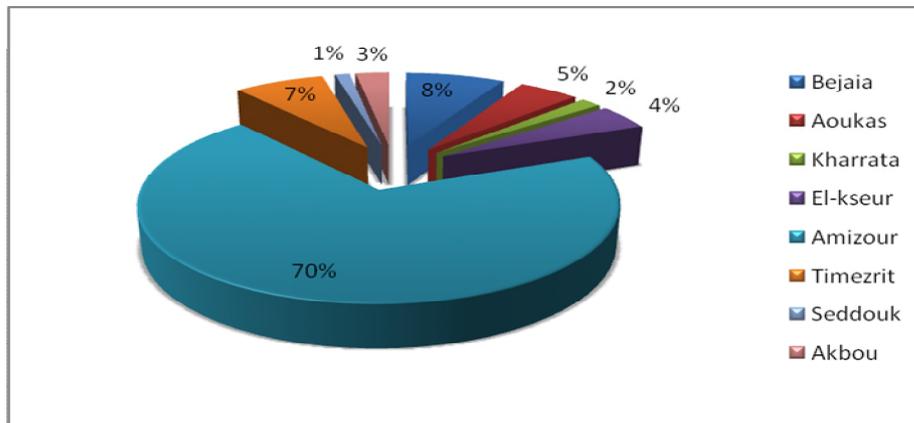


Figure 3 : Présentation graphique de la production de raisin au niveau des différentes communes de la wilaya de Bejaia (DSA, 2012).

La surface du vignoble total à Bejaia est estimée à 487,5 ha. La majorité de la superficie est consacré pour le cépage *Dattier* avec une surface de 296 ha suivi du cépage *Cardinal* avec 101,5 ha puis *Muscat Blanc* avec 12,2 ha (fig.4) (DSA, 2012).

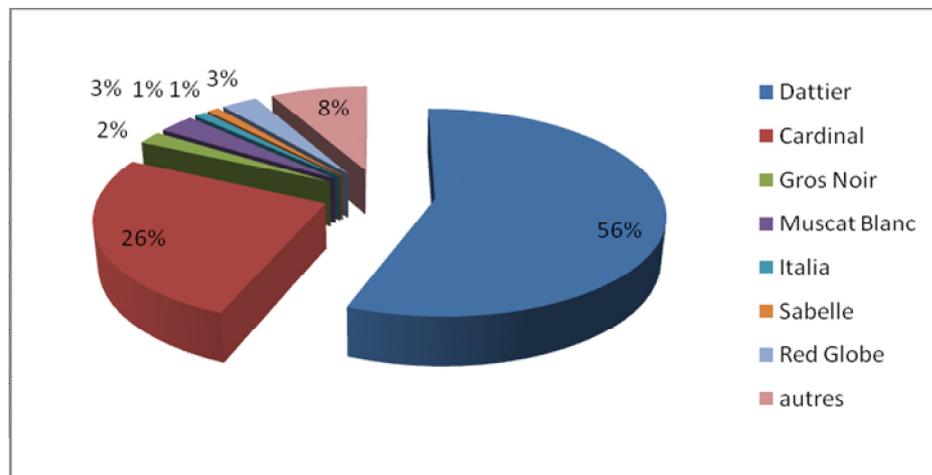


Figure 4 : Présentation graphique des cépages cultivés à la wilaya de Bejaia (DSA, 2012).

VII. Classification commerciale des cépages

Un cépage est un cultivar de vigne c'est-à-dire une variété au sein d'une population composée d'individus génétiquement différents mais qui présentent des caractéristiques

proches (par exemple : forme des feuilles et des grappes) (Reynier, 1986 ; Levadoux *et al.*, 1971 ; Chauvet et Reynier, 1979).

Les cépages peuvent être classés selon leur destination finale en raisins de cuve, raisins de table ou encore en raisins secs (Zhou et Raffoul, 2012). La vigne cultivée pour la production de raisin de table doit produire des fruits de qualité destinés à la consommation en frais (ITAF, 2011).

Les raisins peuvent aussi être divisés en deux groupes selon la couleur de leur peau : Les cépages blancs et les cépages rouges. Les premiers sont des raisins à peau de teinte claire, vert pale ou jaune plus ou moins dorés, les seconds sont des raisins dont la peau noircit à maturité et qui prennent alors des nuances allant du rosé, rouge au noir- violet (Chira *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'époque de maturité joue un grand rôle économique et permet de classer les cépages suivant l'échelle commerciale en raisins précoces, raisins de saisons et raisins tardifs (ITAF, 2011).

VIII. Antioxydants des raisins

L'oxygène est indispensable aux processus vitaux et notamment à la respiration cellulaire. Toutefois, le métabolisme de l'oxygène peut générer des éléments réactifs appelés radicaux libres, notamment l'ion superoxyde (O_2°) et l'ion hydroxyle (OH°) (Menvielle-Bourg, 2005). Ces espèces réactives de l'oxygène sont produites physiologiquement, certaines contribuant d'ailleurs à la régulation de fonctions biologiques, et participent à la réponse au stress, notamment d'origine infectieuse (Hennebelle *et al.*, 2004), mais leur production excessive entraîne des dommages sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires (peroxydation lipidique), pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Derbel et Ghedira, 2005 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Dans les conditions dites « physiologiques », il y a équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes endogènes de défenses antioxydantes. Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase), ainsi que des molécules antiradicalaires (« *scavengers* »), qui piègent les radicaux libres (β -carotène et vitamines antioxydantes A, C, E) (Menvielle-Bourg, 2005 ; Afonso *et al.*, 2007). Cependant, certaines conditions s'accompagnent d'une production accrue de dérivés instables d'oxygène : métabolisme des sucres au cours de l'effort physique, métabolisme des graisses, réponse immunitaire notamment vis-à-vis des infections microbiennes, exposition à des

rayonnements, pollution, tabagisme... Par ailleurs, des études épidémiologiques indiquent que les niveaux de défenses antioxydantes diminuent avec l'âge (Menvielle-Bourg, 2005 ; Beaudeau et *al.*, 2006 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Pour échapper aux graves séquelles du stress oxydant, une consommation suffisante d'antioxydants s'impose. Les antioxydants alimentaires comprennent des vitamines (A, C et E), certains oligoéléments (Sélénium, Zinc), mais également des éléments bioactifs qui ne sont ni des vitamines ni des minéraux et qui se trouvent naturellement dans les aliments issus du règne végétal « polyphénols et caroténoïdes » (Derbel et Ghedira 2005).

De nombreux composés phénoliques naturels dont les flavonoïdes (flavonols, flavanols, ect.), les acides phénoliques, en particulier les dérivés de l'acide caféique présentent une activité antioxydante marquée. Dans tous les cas, l'effet protecteur dépend des concentrations utilisées et des structures chimiques en présence (Rice-Evans et *al.*, 1997 ; Pokorny et *al.*, 2001 ; Marcheix et *al.*, 2005).

Le raisin est une source d'antioxydants, et spécialement les composés polyphénoliques de haute qualité, qui peuvent être employés dans différentes procédures thérapeutiques (Bucic-Kojic et *al.*, 2007; Breksa III et *al.*, 2010; Lutterodt et *al.*, 2011). La capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres dans le corps humain et à diminuer de ce fait la gravité de leurs dommages sur les molécules biologiques, peut être l'un de leurs mécanismes protecteurs (Chiou et *al.*, 2007; Lafka et *al.*, 2007).

VIII.1. Caroténoïdes

Ce sont des pigments naturels présents dans les aliments d'origine végétale. Ils leur donnent la couleur jaune qui vire vers le rouge. Ce groupe de pigment est très largement répandu dans la nature (Alias et *al.*, 2008).

Le groupe des caroténoïdes comprend deux classes de composés voisins : d'une part les carotènes, hydrocarbures insaturés, et d'autre part leurs dérivés oxygénés, les xanthophylles (Faure et *al.*, 1999 ; Borel *et al.*, 2005). La structure de base des caroténoïdes est formée par l'enchaînement de huit unités isopréniques. Tous les caroténoïdes dérivent, par cyclisation, déshydrogénation et oxydation de la même molécule (C₄₀ H₅₆) : le lycopène (fig.5) (Derbel et Ghedira, 2005).

Les caroténoïdes de raisin les plus abondants sont : β -carotène et lutéine, représentant approximativement 85% de la totalité (Mendes-Pinto, 2009 ; Bunea *et al.*, 2012), et à ceux-ci

sont accompagnés d'autres caroténoïdes minoritaires comme le néaxanthine, violaxanthine, luteine-5,6-époxyde, zéaxanthine, néochrome, flavoxanthine et lutéoxanthine (Mendes-Pinto, 2009).

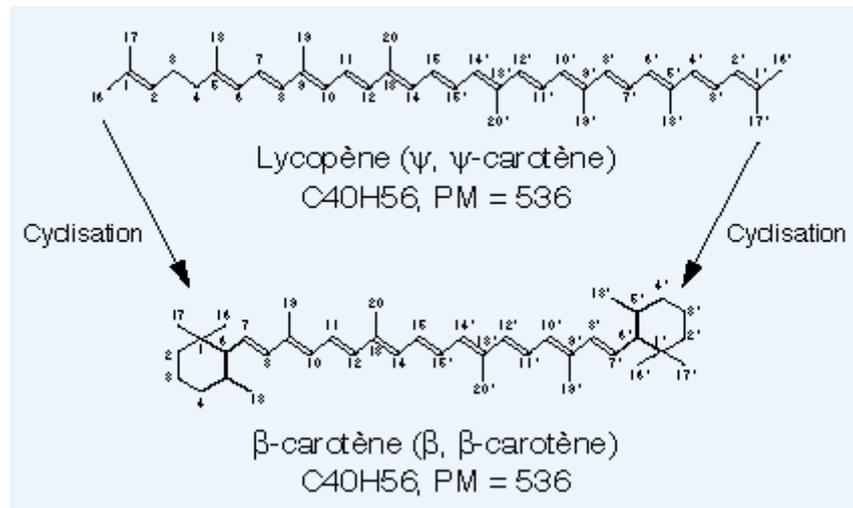


Figure 5 : Représentation schématique du lycopène, caroténoïde linéaire. Par cyclisation des extrémités, on obtient la structure du β-carotène (Faure *et al.*, 1999).

VIII.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont une famille de substances chimiques caractérisées par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Bruneton, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Dávalos *et al.*, 2006). Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules (Collin *et al.*, 2011a ; Hennebelle *et al.*, 2004), sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins (Wollgast et Anklam, 2000; Chiou *et al.*, 2007). Ils sont classés parmi les antioxydants naturels vu qu'ils permettent de diminuer la formation des radicaux libres et de complexer les ions métalliques (Collin *et al.*, 2011b ; Ramirez-Lopez *et al.*, 2014).

Les polyphénols du raisin sont répartis en deux groupes : le groupe des flavonoïdes et le groupe des non flavonoïdes. Les composés flavonoïdes les plus abondants dans le raisin sont les flavonols, les anthocyanes et les flavon-3-ols (Cheynier *et al.*, 2006 ; Perestrelo *et al.*, 2012 ; Rebello *et al.*, 2013). Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénols, qui

comprennent les acides benzoïques et les acides hydroxycinnamiques, et les stilbènes (Chira *et al.*, 2008).

VIII.2.1. Composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆) de type 2-phényl-benzopyrone (fig.8) (Collin *et al.*, 2011a).

VIII.2.1.1. Flavonols

Les flavonols sont des composés flavonoïdes largement répandus. Ce sont des pigments jaunes qui s'accumulent dans les baies à maturité, notamment en réponse à l'exposition au rayonnement UV (Saucier *et al.*, 2011).

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin : Le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine (fig.6). Généralement, ils s'accumulent sous forme glycosylée, (Cheynier et Rigaud, 1986 ; Castillo-Munoz *et al.*, 2010; Saucier *et al.*, 2011). La conjugaison est le plus souvent en position 3 du noyau aromatique C, bien que des substitutions en positions 5,7,4',3' et 5' soient possibles. Le nombre d'aglycones est assez faible, mais il existe un très grand nombre de conjugués, le kaempférol ayant à lui seul 200 conjugués avec des motifs osidiques différents. Il existe une forte variabilité en concentration selon la saison et la variété prise en compte. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges (Chira *et al.*, 2008).

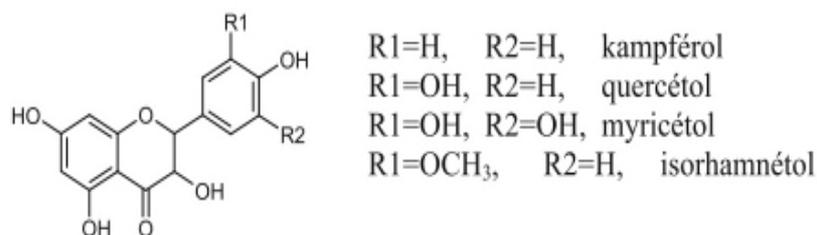


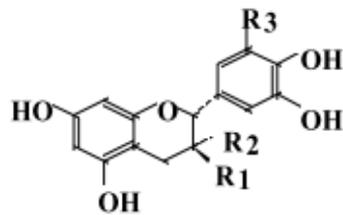
Figure 6 : Structure des flavonols (Chira *et al.*, 2008).

VIII.2.1.2. Flavanols (flavan-3-ols)

Les flavan-3-ols sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatechine, jusqu'aux oligomères et polymères appelés tanins condensés ou proanthocyanidines, parce qu'ils libèrent des anthocyanidines par chauffage en milieu acide (Conde *et al.*, 2007 ; Saucier *et al.*, 2011).

Les tanins condensés du raisin sont formés de la catéchine et de l'épicatéchine et se divisent en plusieurs classes, selon le schéma d'hydroxylation de leurs unités constitutives. Les oligomères de procyanidines sont formés de 2 à 5 unités de catéchines ou d'épicatéchine, les polymères étant formés de 6 unités ou plus. De plus, les flavan-3-ols peuvent être estérifiés avec l'acide gallique ou bien hydroxylés pour former des gallocatéchines (épicatéchine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) et des gallotanins, unités constitutives des prodelphinidines (fig.7) (Cheynier *et al.*, 2006 ; Cadot *et al.*, 2006a ; Guerrero *et al.*, 2009).

monomères :



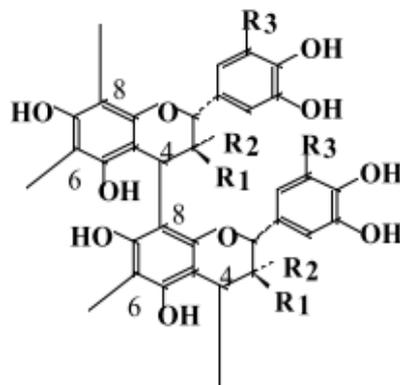
$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$: (+)-catéchine

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

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

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

proanthocyanidols :



$R_3 = \text{H}$: procyanidols

$R_3 = \text{OH}$: prodelphinidols

$R_1, R_2 = \text{H}, \text{OH}, \text{O-G}$

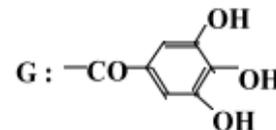


Figure 7: Structure des tanins de raisin (Cheynier *et al.*, 2006).

Dans la baie de raisin, les flavan-3-ols sont principalement localisés dans les pépins et la pellicule. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), partiellement galloylées, alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine). Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation (D_{Pm}), peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule (Cheynier *et al.*, 2006 ; Cadot, 2008).

VIII.2.1.3. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments rouges situés dans le suc vacuolaire des cellules de la pellicule et plus exactement dans les trois ou quatre premières assises cellulaires de l'hypoderme. Elles sont aussi présentes dans la pulpe des cépages teinturiers (Conde *et al.*, 2007 ; Cadot, 2008 ; Collin *et al.*, 2011a).

Leur structure de base est constituée de deux cycles benzéniques reliés par un ion flavylum généralement sous forme de conjugués glycosylés en C-3 (Chira *et al.*, 2008). Le sucre peut être substitué par l'acide acétique, l'acide *p*-coumarique ou l'acide caféique (Cheynier *et al.*, 2006 ; Conde *et al.*, 2007). Contrairement à d'autres espèces (hybrides) qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes 3,5 diglucosides, l'espèce *Vitis vinifera* n'en contient que des traces et se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-O-glucoside et de ses dérivés acylés (Chira *et al.*, 2008 ; Guerrero *et al.*, 2009), bien que la composition relative en anthocyanes varie selon le cépage. Cinq anthocyanidines sont distinguées dans le genre *Vitis* : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (fig.8) (Cheynier *et al.*, 2006, Cadot, 2008 ; Collin *et al.*, 2011a).

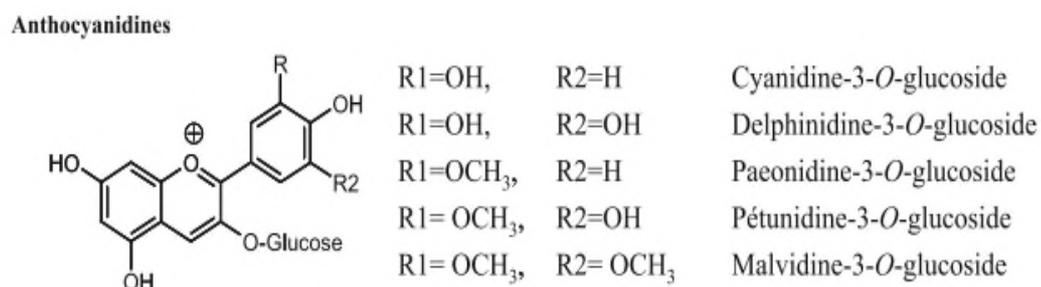


Figure 8 : Structure des anthocyanes de raisin (Collin *et al.*, 2011a).

VIII.2.2. Composés non-flavonoïdes

Les principaux non-flavonoïdes contenus dans la baie de raisin sont les acides phénoliques et les stilbènes (Chira *et al.*, 2008).

VIII.2.2.1. Acides phénoliques

➤ Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C₆-C₁, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (fig.9) (Macheix *et al.*, 2006 ; Chira *et al.*, 2008).

Ces composés existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tannins. Le principal représentant des acides benzoïques dans le raisin est l'acide gallique, présent surtout comme substituant des flavanols (Cheynier *et al.*, 2006).

➤ Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique (Macheix *et al.*, 2006). Dans le raisin, les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, *p*-coumarique et férulique) se trouvent en majorité sous forme d'esters tartriques (acides coutarique, caftarique et fertarique) mais ils sont aussi impliqués dans l'acylation des anthocyanes (Cheynier *et al.*, 2006 ; Perestrelo *et al.*, 2012). Ces constituants sont surtout présents dans la pulpe de la baie de raisin. Le composé majeur des acides hydroxycinnamiques dans le raisin est l'acide caftarique (ester caféoyl-tartrique) (Chira *et al.*, 2008).

Acides phénoliques

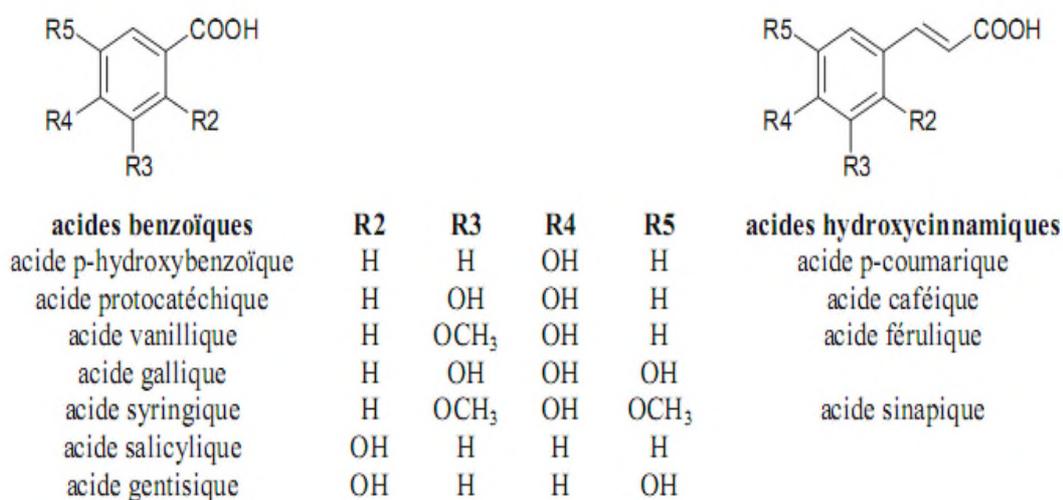


Figure 9 : Structures des acides phénoliques (Chira *et al.*, 2008).

VIII.2.2.2. Stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C₆-C₂-C₆, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène, formant un système conjugué (Derbel et Ghedira, 2005). Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le *trans*-resvératrol (Bavaresco *et al.*, 2009). Le resvératrol se trouve sous forme *cis* et *trans*, et est présent dans les tissus végétaux

principalement sous forme de *trans*-resvératrol-3-O-glucosides (*trans*-picéide) (fig.10). Il existe des formes oligomères des stilbénes, identifiées dans le raisin, telles que le pallidol et les viniférines (Chira *et al.*, 2008).

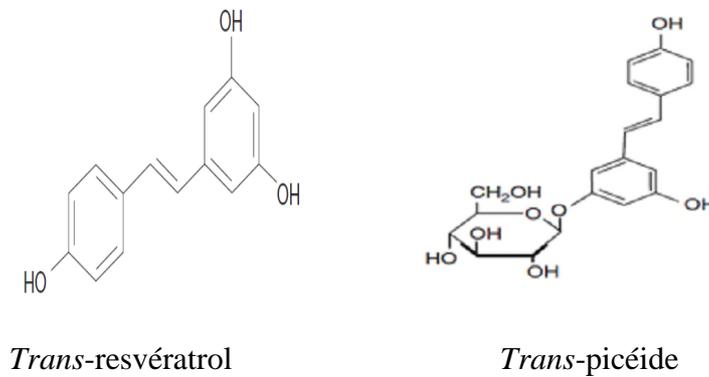


Figure 10 : Structure de différentes formes du resvératrol (Dietrich et Pour-Nikfardjam, 2009).

VIII.4. Modes d'action des polyphénols comme antioxydants

Les composés phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons, comme chélateurs de métaux de transition (Márquez-García *et al.*, 2009), et comme inhibiteurs d'enzymes génératrices de radicaux libres et inducteurs de la synthèse d'enzymes antioxydantes (Hennebelle *et al.*, 2004).

Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes et agissent à différents niveaux des réactions radicalaires (Robards *et al.*, 1999 ; Derbel et Ghedira, 2005). Cette activité est étroitement liée à leurs propriétés structurales, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyls et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim *et al.*, 2002). L'activité antioxydante des composés phénoliques augmente avec le degré de polymérisation et diminue avec le degré de méthylation et de glycosylation au niveau des groupements hydroxyls (Marcheix *et al.*, 2005).

VIII.4.1. Chélation des métaux

Les composés phénoliques inhibent la formation de radicaux libres par la chélation de métaux tels que le Cuivre, le Fer et l'Aluminium (fig.11) (Virgili *et al.*, 2001 ; Gaetke et Chow, 2003 ; Moridani *et al.*, 2003 ; Hennebelle *et al.*, 2004 ; Marcheix *et al.*, 2005). Ces ions métalliques renforcent les effets nocifs du stress oxydant, en stimulant la production des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) (Pietta, 2000 ; Virgili *et al.*, 2001). Ces composés en chélatant les ions métalliques, forment des complexes de coordination avec ces métaux, en occupant tous les

emplacements et peuvent ainsi convertir les ions métalliques en complexes insolubles, empêchant leurs interactions avec les intermédiaires lipidiques (Virgili *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2004).

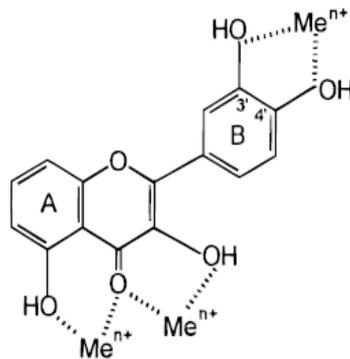


Figure 11: Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

VIII.4.2. Neutralisation des radicaux libres

Les composés phénoliques sont des piègeurs efficaces de radicaux libres (Hollman *et al.*, 1996 ; Shi *et al.*, 2001 ; Gaetke et Chow, 2003 ; Hennebelle *et al.*, 2004), et ceci grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (Derbel et Ghedira 2005) contre l'anion superoxyde, le radical hydroxyl et l'oxygène singulet, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes préviennent la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux libres, qui sont susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (Harborne et Williams, 2000 ; Lahouel *et al.*, 2004) et protègent ainsi les membranes cellulaires (Havsteen, 2002).

VIII.4.3. Inhibition d'enzymes

Les composés phénoliques affectent l'activité de nombreux systèmes enzymatiques impliquée dans le stress oxydant (Johnson, 2001 ; Shi *et al.*, 2001 ; Marcheix *et al.*, 2005 ; Hennebelle *et al.*, 2004). Certains flavonoïdes comme l'apigénine, la quercétine et la myricétine inhibent la xanthine oxydase (Johnson, 2001 ; Shi *et al.*, 2001 ; Morelle-Lauzanne, 2006), qu'est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (Nijveldt *et al.*, 2001 ; Da silva *et al.*, 2004).

IX. Techniques extractives des substances bioactives : les composés phénoliques

L'extraction est basée sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange à extraire peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide (Tando et Rane, 2008 ; Ijaiya *et al.*, 2014).

L'extraction solide-liquide est une opération physique qui peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de masse entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Majkodunmi, 2015). Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire. Les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et migrent dans le solvant, jusqu'au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à l'épuisement de la phase solide ou des structures végétales (Pangarkar, 2008 ; Tando et Rane, 2008 ; Alupului *et al.*, 2012).

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les matrices végétales. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles, utilisées depuis longtemps, ou nouvelles, développées plus récemment (Azmir *et al.*, 2013 ; Baghdikian *et al.*, 2016 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve la macération et l'extraction par Soxhlet (Pandey et Tripathi, 2014 ; Wong-Paz *et al.*, 2014 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017). Dans la catégorie « techniques nouvelles » on peut citer l'extraction assistée par microondes (Yang *et al.*, 2013 ; Wong-Paz *et al.*, 2014), l'extraction assistée par ultrasons (Bimakr *et al.*, 2013 ; Muñoz-Márquez *et al.*, 2013) , et l'extraction avec des fluides supercritiques (Mičić *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2011).

Dans nos études d'extraction, nous avons utilisé une technique conventionnelle, l'extraction par macération, ainsi qu'une technique plus récente, l'extraction assistée par microondes. Ces méthodes d'extraction sont choisies pour leur simplicité de mise en œuvre et leur efficacité, dont les caractéristiques vont maintenant être détaillées

IX.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)

L'extraction par macération conventionnelle ou l'extraction conventionnelle par solvant est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple et la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant

avec ou sans agitation, habituellement à température ambiante pour une durée déterminée (Azwanida, 2015 ; Varma, 2016 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction, le nombre de cycles d'extraction et la température (Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Majkodunmi, 2015 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017). La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint (Singh, 2008 ; Azmir *et al.*, 2013 ; Varma, 2016).

La macération est une méthode simple utilisant un matériel et un équipement non compliqué et, pour cette raison, c'est un choix classique dans de nombreuses recherches. Malheureusement, la durée d'extraction est longue et peut parfois prendre plusieurs semaines (Ngaha Njila *et al.*, 2017).

IX.2. Extraction assistée par microondes (EAM)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et champ magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre (fig. 12), qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2,45 GHz (Jain *et al.*, 2009 ; Gourguillon *et al.*, 2016 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

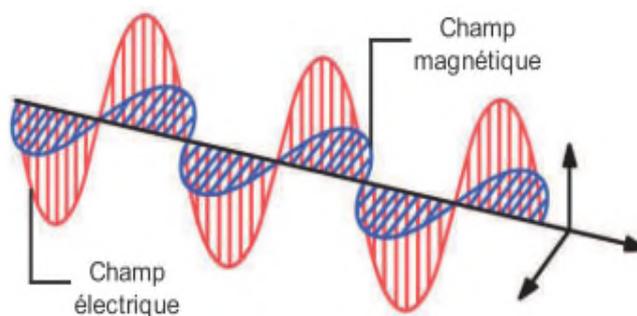


Figure 12: Représentation graphique d'un champ électrique

Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infrarouges et les radiofréquences (fig. 13), avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm (Jain *et al.*, 2009).

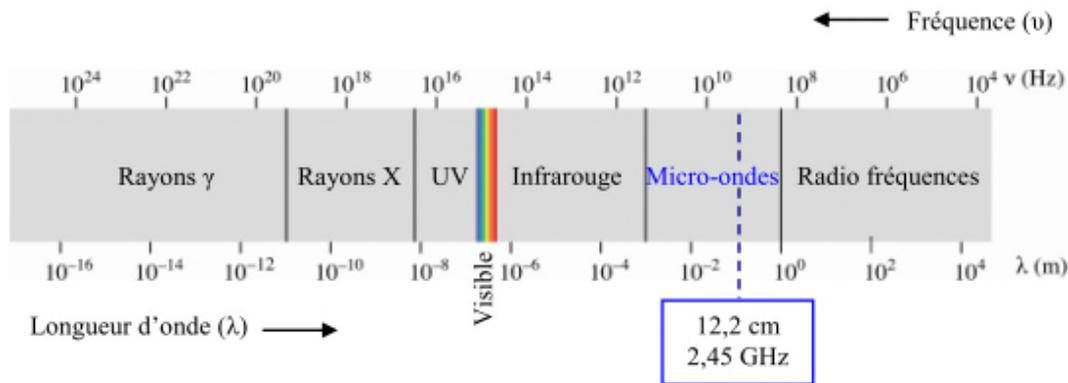


Figure 13: Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques.

Dans cette technique d'extraction, la matrice végétale (sèche ou fraîche) est généralement homogénéisée avec un solvant et la suspension est irradiée par microondes permettant de chauffer le solvant très rapidement. La chaleur ainsi obtenue est transférée à la matière végétale par conduction. Le processus d'extraction est équivalent aux autres techniques à la différence que le chauffage est rapide, sans inertie et sans perte de chaleur (Jain *et al.*, 2009 ; Gourguillon *et al.*, 2016 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Par ailleurs, dans le cas de matrices fraîches à forte teneur en eau, l'extraction peut être effectuée sans solvant. En effet, la teneur en eau de la matrice a une grande importance dans le processus d'extraction, car les molécules d'eau, qui ont une forte capacité à absorber les micro-ondes, jouent un rôle important dans le processus d'échauffement. Les microondes pénètrent les matières biologiques qui s'échauffent grâce à l'eau qu'elle contient. L'humidité chauffée s'évapore, créant une pression de vapeur élevée. Ce phénomène accélère la rupture des cellules, facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Pangarkar, 2008 ; Alupului *et al.*, 2012 ; Gourguillon *et al.*, 2016 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

L'échauffement rapide constitue l'une des spécificités du chauffage micro-onde. Du fait de l'habileté des micro-ondes à pénétrer directement au cœur des matériaux, le transfert de chaleur se propage de l'intérieur vers l'extérieur de celui-ci (le volume traité devient lui-même une source de chaleur), au contraire des chauffages classiques par conduction, pour lesquels le

transfert de chaleur s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur induisant une cinétique d'extraction plus longue (Pangarkar, 2008).

Le principe de chauffage de la matière par les microondes est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément: la conduction ionique et la rotation dipolaire à travers des inversions de dipôles et de déplacement d'ions chargés présents dans le soluté et le solvant. La conduction ionique est la migration électrophorétique des ions lorsqu'un champ électromagnétique est appliqué, et la résistance de la solution à ce flux d'ions entraîne la friction qui réchauffe la solution. La rotation dipolaire signifie réarrangement des dipôles avec le champ appliqué. La rotation dipolaire est liée au mouvement alternatif des molécules polaires, qui tentent de s'aligner avec le champ électrique. Les collisions multiples de cette agitation moléculaire génèrent une libération d'énergie sous forme de chaleur (Jain *et al.*, 2009 ; Azmir *et al.*, 2013).

Ces deux phénomènes sont dépendants du type de solvant utilisé. Les solvants d'extraction les plus communément rencontrés en EAM sont ceux qui possèdent une constante diélectrique forte. C'est le cas des solvants polaires qui possèdent un dipôle permanent et qui vont donc fortement absorber les micro-ondes, au contraire des solvants apolaires qui possèdent une constante diélectrique faible (Tableau I) (Jain *et al.*, 2009 ; Azwanida, 2015 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Tableau II: Valeurs de constante diélectrique (ϵ') obtenues à 20°C pour les solvants les plus communément utilisés en EAM (Azwanida, 2015).

Solvant	ϵ'
Hexane	1,89
Toluène	2,40
Dichlorométhane	8,9
2-Propanol	19,9
Acétone	20,7
Ethanol	24,3
Méthanol	32,6
Eau	78,5

Les principaux paramètres de l'extraction assistée par micro-ondes sont : le type du solvant, la puissance micro-ondes et le temps d'extraction (Hithamani et Ramalakshmi, 2013).

Type du solvant

Comme pour les autres techniques d'extraction le choix du solvant est déterminé par la solubilité des molécules d'intérêt et par les interactions solvant-matrice. Cependant, en EAM le choix du solvant est surtout relié à sa capacité à absorber les micro-ondes. Si le solvant est apolaire, les molécules de solvant sont « transparentes » vis-à-vis du rayonnement et n'absorbent pas ou absorbent très peu les micro-ondes, dans ce cas, c'est la matrice végétale qui captera directement le rayonnement. Par contre si le solvant est polaire, les radiations sont absorbées par ce dernier, la matière végétale s'échauffera par conduction de la chaleur produite dans le solvant (Azwanida, 2015).

Les solvants les plus utilisés sont l'hexane, toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. En général, l'EAM peut être effectuée avec le même solvant utilisé dans l'extraction conventionnelle. Le volume du solvant est aussi un point important. En règle générale, la quantité de solvant utilisée doit être suffisante pour assurer que la matrice végétale soit toujours immergée tout au long de l'irradiation (Rafiee *et al.*, 2011 ; Azwanida, 2015).

Temps d'extraction

Le temps d'extraction est l'un des avantages de la EAM car il est généralement court: quelques secondes à plusieurs minutes. De plus, il a pu être démontré que des temps plus longs d'extraction n'amélioreraient pas forcément le rendement d'extraction et qu'ils induisaient des risques de dégradation de molécules thermolabiles plus élevés (Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Puissance d'irradiation

La puissance d'irradiation est choisie en fonction du temps d'extraction que l'on veut appliquer. Elle est généralement minimisée pour éviter d'atteindre des températures d'extraction trop élevées et à l'inverse, augmentée pour diminuer le temps d'extraction (Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Par rapport aux techniques d'extraction classiques, les principaux avantages de l'EAM sont sa rapidité, la réduction du volume de solvant utilisé, tout en ayant un rendement d'extraction amélioré. De plus, l'EAM est simple d'utilisation, sélective et peu onéreuse (Pangarkar, 2008 ; Gallo *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2013 ; Ngaha Njila *et al.*, 2017). Néanmoins, de faibles rendements d'extraction peuvent être obtenus lorsque des solvants apolaires sont utilisés et ne peut pas être appliquée pour l'extraction de composés thermosensibles. Par ailleurs, cette technique nécessite la maîtrise parfaite du temps de chauffage par micro-ondes (Ngaha Njila *et al.*, 2017).

Partie
Expérimentale

I. Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

Six variétés de raisin (*Vitis vinifera*) nommées *Ahmar Bou-Amar*, *Cardinal*, *Dattier*, *Muscat Blanc*, *Muscat Noir* et *Italia* sont utilisées dans la présente étude. Ces variétés proviennent de la ferme EL-Aifa située à la commune d'Amizour de la wilaya de Bejaia (Algérie). Les raisins, environ 3 Kg, sont récoltés à partir de différentes parties de la vigne durant le stade de maturité de chaque variété de l'année 2013. Le prélèvement des grappes de raisin est effectué avec des ciseaux sans endommager les baies. Tous les prélèvements sont placés directement dans des boîtes rigides qui sont ensuite déposées dans une glacière. Les caractéristiques de chaque variété sont récapitulées dans le tableau (III). L'identification des différents cépages a été faite par la DSA de la Wilaya de Bejaia.

II. Préparation des échantillons

Les raisins ont été bien lavés à l'eau de robinet, égouttés, puis épluchés pour séparer les différentes fractions des baies: la pellicule, la pulpe et les pépins. Les pulpes sont conservées à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction. Les pellicules et les pépins ont été récupérés et séchés dans une étuve à 40°C ensuite ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique et tamisés, les fractions dont le diamètre inférieur à 500 µm ont été utilisées pour l'extraction. Les poudres obtenues sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité pour des utilisations ultérieures.

III. Analyses physico-chimiques

III.1. Le taux d'humidité

1g de chaque fraction de chaque cépage a été séché dans une étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'au poids constant (Boussetta *et al.*, 2012). Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage selon la formule suivante:

$$\text{Humidité (\%)} = (P_1 - P_2) * 100 / (P_1 - P_3)$$

P_1 : poids initial de l'échantillon et du creuset ;

P_2 : poids final de l'échantillon et du creuset après séchage ;

P_3 : poids du creuset vide.

Tableau III: Caractéristiques morphologiques des raisins étudiés

cépages	Caractéristiques	Photographies
<i>Ahmar Bou- Amar</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de cépage rouge. - Grappes grandes aux baies grosses d'une belle couleur rose à rose foncé avec des portions restant vertes. - Saveur assez agréable, pas trop sucrée - Peau épaisse. - Maturité tardive. 	
<i>Cardinal</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de cépage rouge. - Grosses grappes aux grains très gros rouges. - Epaisseur de peau moyenne. - Maturité précoce. 	
<i>Dattier</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de cépage blanc. - Belles grappes aux baies dorées allongées en forme de datte. - Gout très agréable sucré. - Peau épaisse. - Maturité saisonnière (fin juillet début septembre). 	
<i>Italia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de cépage blanc. - Belles grappes aux baies ovoïdes. - Saveur légèrement musquée. - Peau épaisse. - Maturité saisonnière (de mi-août à septembre). 	

<i>Muscat Blanc</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Fruit de cépage blanc. - Grappes moyennes à grains ovoïdes à ronds. -Saveur musquée spéciale qu'est très appréciée. - Maturité saisonnière 	
<i>Muscat Noir</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruit de cépage rouge. - Grappes moyennes à grains ovoïdes. -Saveur bien sucrée, agréablement musquée. - Maturité saisonnière (septembre). 	

III.2. Le pH et l'acidité

Le pH des jus des différents cépages a été mesuré à l'aide d'un pH mètre. L'acidité a été déterminée par la méthode volumétrique ; 10ml de jus de raisin ont été neutralisés avec de l'hydroxyde de sodium (0,01N), en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine, jusqu'à un virage de la couleur au rose. L'acidité est exprimée en gramme d'acide tartrique par litre (Geroyiannaki *et al.*, 2007).

$$\text{Acidité g / L} = N_b * V_b * M / V_a * P$$

Où :

N_b : normalité de la solution d'hydroxyde de sodium (0,01N).

V_b : volume de la solution d'hydroxyde de sodium (chute de burette en ml).

M: masse moléculaire de l'acide tartrique (150,1g).

V_a : volume de jus (ml).

P : nombre de protons portés par l'acide tartrique (2).

III.3. Le Brix

Le pourcentage de Brix est défini comme étant la teneur en sucre exprimée en gramme par 100 gramme d'échantillon (g/100g). Ce paramètre a été déterminé avec un réfractomètre.

IV. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction utilisée, le ratio échantillon/solvant, le temps et la température d'extraction. Dans la présente étude deux méthodes d'extraction ont été appliquées pour extraire les composés phénoliques à partir des différentes fractions des baies des raisins étudiés : les pulpes, les pellicules et les pépins. L'extraction par macération conventionnelle et l'extraction assistée par microondes ont été étudiées. La variété *Ahmar Bou-Amar* a été utilisée dans la partie optimisation des composés phénoliques.

IV.1. Type du solvant d'extraction

Dans la première étape, le type du solvant d'extraction des composés phénoliques totaux à partir des différentes fractions de deux cépages (*Ahmar Bou-Amar* et *Italia*) a été déterminé, les solvants suivants ont été utilisés: l'acétone 50%, l'éthanol 50%, le méthanol 50% et l'eau, avec fixation du ratio échantillon/solvant, du temps et de la température d'extraction à 0,1g/20ml, 30 min et 25°C, respectivement.

IV.2. Préparation des extraits suivant la méthodologie des surfaces de réponses

IV.2.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques a été réalisée par l'application de la méthode des surfaces de réponses suivant le plan Box-Behnken sur trois échantillons de la baie de raisin de la variété *Ahmar Bou-Amar* : les pépins, la pellicule et la pulpe.

En s'appuyant sur une étude d'optimisation préliminaire basée sur la méthode séquentielle (étape par étape), trois paramètres quantitatifs d'influences significatives sur l'extraction des composés phénoliques ont été sélectionnés : la concentration du solvant approprié pour chaque fraction, le temps d'extraction et le rapport échantillon solvant. En se basant sur cette même étude, trois niveaux ont été fixés pour chaque paramètre déjà cités : le niveau bas (-1), le niveau élevé (+1) et intermédiaire (0). Le tableau IV résume les différentes expériences réalisées pour chaque échantillon.

Les composés phénoliques totaux ont été extraits à partir de 50 mg de la poudre de pépins, de 100 mg de la poudre de la pellicule et de 12 g de la purée de pulpe du cépage *Ahmar Bou-Amar*, auxquels ont été ajoutés différents volumes du solvant d'extraction correspondant pour chaque fraction à différentes concentrations, puis les mélanges ont été mis à agitation magnétique durant des temps différents. Le tableau V illustre les différents niveaux appliqués pour chaque fraction. Les différents extraits ont été récupérés par centrifugation à 10000 tpm/10min à une température 10°C puis filtrés, à l'aide d'un filtre en verre de porosité de 1,6

µm. Une concentration des extraits obtenus dans les conditions optimales de la présente étude a été réalisée grâce à un évaporateur rotatif sous vide à une température de 35°C jusqu'à l'obtention de moins de 1 ml de solution ensuite sont repris dans 55% de l'éthanol acidifié par 0,005% d'Acide TriFluoro-Acétique (TFA). La conservation des différents extraits concentrés a été effectuée à une température de -80°C.

Tableau IV: Différentes conditions de préparation des extraits des trois fractions étudiées avec EMC suivant la méthodologie des surfaces de réponses

Expériences	Variables		
	X ₁ - Concentration du solvant (% v/v)	X ₂ -Temps (min)	X ₃ -Ratio (mg/ml)
1	-1	+1	0
2	+1	0	-1
3	-1	0	-1
4	0	-1	-1
5	0	0	0
6	-1	0	+1
7	0	+1	+1
8	+1	-1	0
9	+1	0	+1
10	0	-1	+1
11	0	+1	-1
12	-1	-1	0
13	+1	+1	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Tableau V : Les différents niveaux appliqués pour les paramètres de l'EMC selon la fraction végétale étudiée

Independent variables	Niveaux								
	Pépins			Pellicule			Pulpe		
	(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)
X ₁ - Concentration du solvant (% v/v)	50	65	80	40	55	70	20	40	60
X ₂ -Temps (min)	30	60	90	60	90	120	30	45	60
X ₃ – Ratio (m/v)	1	1,75	2,5	2,5	3,75	5	0,4	0,7	1

m/v : les pépins et la pellicule en mg/ml ; la pulpe en g/ml

IV.2.2. Extraction assistée par microondes (EAM)

L'optimum de deux paramètres relatifs à l'extraction assistée par microondes à savoir le temps d'extraction et la puissance des microondes a été déterminé par l'application de la

méthode des surfaces de réponses sur trois échantillons de la baie de raisin de la variété *Ahmar Bou-Amar* : les pépins, la pellicule et la pulpe. Pour chaque paramètre, trois niveaux ont été fixés en s'appuyant sur une étude préliminaire basée sur la méthode séquentielle (étape par étape): le niveau bas (-1), le niveau élevé (+1) et intermédiaire (0). Le tableau VI résume les différentes expériences réalisées pour chaque échantillon. Le modèle composite central a été utilisé pour évaluer l'effet et les interactions des paramètres sélectionnés sur l'extraction des composés phénoliques.

Tableau VI : Différentes conditions de préparation des extraits des trois fractions étudiées avec EAM suivant la méthodologie des surfaces de réponses

Expériences	Variables	
	X ₁ - Temps (s)	X ₂ -Puissance d'irradiation (w)
1	0	0
2	0	0
3	-1	0
4	-1	-1
5	+1	-1
6	0	+1
7	-1	+1
8	0	0
9	0	-1
10	+1	0
11	+1	+1

L'appareil à micro-ondes utilisé dans cette étude (NN-S674MF, Samsung, Malaisie) a été modifié afin de condenser les vapeurs produites au cours du processus d'extraction donnant ainsi des volumes stables. En ce qui concerne l'extraction, 50 mg de la poudre de pépins, 100 mg de la poudre de la pellicule et 10 g de la purée de pulpe ont été placés dans un ballon de 250 ml contenant le solvant d'extraction. Les échantillons ont été extraits à différents temps d'irradiation et avec des puissances micro-ondes différentes. Le tableau VII illustre les différents niveaux appliqués pour chaque fraction. Les différents extraits sont récupérés par centrifugation à 10000 tpm/10min à une température 10°C puis filtrés, à l'aide d'un filtre en verre de porosité de 1,6 µm. Une concentration des extraits obtenus dans les conditions optimales de la présente étude a été réalisée grâce à un évaporateur rotatif sous vide à une température de 35°C jusqu'à l'obtention de moins de 1ml de solution ensuite ont été repris dans 55% de l'éthanol acidifié par 0,005% d'Acide TriFluoro-Acétique (TFA). La conservation des différents extraits concentrés a été effectuée à une température de -80°C.

Tableau VII : Les différents niveaux appliqués pour les paramètres de l'EAM selon la fraction végétale étudiée.

Independent variables	Niveaux								
	Pépins			Pellicule			Pulpe		
	(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)
X ₁ - Temps (s)	30	75	120	60	120	180	30	90	150
X ₂ -Puissance d'irradiation (w)	200	400	600	200	400	600	200	400	600

V. Dosage des antioxydants

V.1. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques a été déterminée selon la méthode décrite par Velioglu *et al.* (1998). 200µl d'extrait ont été mélangés avec 1500µl du réactif de Folin- Ciocalteu (dilué au 1/10). Après 3 min, 1500µl de carbonate de sodium (6%) ont été additionnés. L'absorbance a été mesurée à 760 nm après 60 min d'incubation. La teneur en composés phénoliques des pépins et des pellicules est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/ g MS). Quant à celle des pulpes, elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par 100g de matière fraîche (mg EAG/ 100g MF) par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe).

V.2. Anthocyanes

V.2.1. Extraction

Pour déterminer le type du solvant d'extraction des anthocyanes à partir de la poudre des pellicules des trois variétés rouges, 100mg de chaque échantillon ont été extraits avec trois solvants d'extraction contenant 0,2% d'acide formique: éthanol acidifié, méthanol acidifié et acétone acidifié. Avec fixation des autres paramètres d'extraction. L'opération a été répétée jusqu'à l'épuisement de la couleur.

Une fois le solvant approprié est sélectionné, les concentrations du solvant suivantes : 25%, 50%, 75% et 100% ont été utilisées pour déterminer la meilleure concentration pour avoir une teneur maximale en anthocyanes de la poudre des pellicules.

V.2.2. Dosage

La teneur en anthocyanes des variétés rouges a été déterminée selon la méthode décrite par Bordiga *et al.*, (2011). Le dosage des anthocyanes consiste à ajouter 900µl d'extrait à 900µl de l'éthanol 70% acidifié (HCl 1%). La couleur rouge en milieu acide des anthocyanes permet leur quantification par la mesure de l'absorbance à 540 nm. La teneur en anthocyanes est calculer par

la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la Malvidine 3-glucoside. Les résultats sont exprimés en mg équivalent Malvidine 3-glucoside par 100g de matière sèche (mg EMv/100g MS). Les teneurs en anthocyanes totales sont calculées selon la formule suivante :

$$T_{Ath} = A * D * 16,17$$

Où :

T_{Ath} : teneur en anthocyanes ;

A : Absorbance de l'extrait ;

D : facteur de dilution ;

16,17 : facteur de conversion correspondant à la Malvidine 3-glucoside

V.3. Vitamine C

La teneur en vitamine C des pulpes des variétés a été déterminée selon la méthode décrite par Mau *et al.* (2005). 5g d'échantillon ont été broyés et additionnés de 20mL d'acide oxalique (0,4%). Après agitation pendant 15 min, le mélange a été filtré et centrifugé à 5000 tpm/ 20 min. 500 µl du filtrat a été additionné de 2500 µl de 2,6-dichloroindophénol (0,003%), et l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 515nm. Les concentrations en acide ascorbique sont exprimées en mg d'acide ascorbique par 100g de matière fraîche (mg AA/100gMF), en se référant à une courbe étalonnage (Annexe).

V.4. Caroténoïdes

10g d'échantillon ont été broyés et mélangés avec 10mL de solvant d'extraction (hexane /acétone/éthanol, 5,5/2,5/2). Après agitation pendant 10min, le surnageant a été récupéré, l'opération a été répétée deux fois. 1ml d'hydroxyde de potassium (1M) a été additionné à l'ensemble des surnageants, le mélange a été incubé pendant 40 min dans une ampoule à décanter ; après séparation des deux phases, la phase supérieure a été récupérée (Soto-Zamora *et al.*, 2005). La teneur en caroténoïdes a été déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase hexanique à 450nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de β-carotène par 100g de matière sèche (mg EβC/100g) pour les pépins et pellicules et par 100g de matière fraîche pour les pulpes en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe).

VI. Profils phénoliques

VI.1. Analyse des acides phénols, flavonols et anthocyanes par HPLC

La séparation des composés phénoliques a été réalisée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (WATERS 2965) sur une colonne C18 (PHENOMENEX

KINETEX 18 RP 100 Å) (25 cm x 4,6 mm, 5 µm). L'appareil est couplé au détecteur UV à barettes de diodes WATERS 2996 (PDA),

Les analyses ont été effectuées sur les extraits concentrés bruts suivant les conditions décrites par Roggero *et al.* (1992). Les éluants utilisés sont constitués des solutions A (acide formique/eau/acétonitrile à 10:60:30, v/v) et B (acide formique/eau à 10:90, v/v), dont les gradients adoptés sont indiqués dans le tableau VIII. Un volume d'injection de 20µl de chaque extrait avec un débit de 0,8ml/min et une température de l'atmosphère ambiante ont été adoptés. Le dosage a duré 30min. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 520, 360 et 320 nm pour les anthocyanes, les flavonols et les acides phénols, respectivement. Toutes les analyses ont été effectuées en double.

Tableau VIII: Gradient linéaire utilisé pour la séparation des anthocyanes, des flavonols et des acides phénols

Temps (min)	% A	% B
0	20	80
26	85	15
30	20	80

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-Vis par comparaison avec des chromatogrammes références dans les mêmes conditions de travail. Les résultats sont exprimés en mg/kg d'échantillon (MS pour les pépins et les pellicules et MF pour les pulpes) en « équivalent 3-glucoside de malvidol », en « équivalent 3-glucoside de quercétol » et en « équivalent acide caftarique » pour les anthocyanes, les flavonols et les acides phénols, respectivement.

VI.2. Analyse des tanins condensés par HPLC

VI.2.1. Fractionnement des tanins

Etant donné que les pellicules et les pulpes ne contiennent pas que les tanins, un fractionnement préalable est nécessaire afin d'obtenir une bonne séparation sur la colonne HPLC (Brossaud, 1999). Le fractionnement a été réalisé par chromatographie à basse pression en utilisant une colonne Toyopearl® TSK - HW-40(F) (Tosoh Corporation, Japon) de 300 mm de longueur et 10 mm de diamètre interne contenant 10cm de Fractogel. Ce gel permet théoriquement la séparation des molécules en fonction de leurs poids moléculaires. Cependant, dans le cas des flavonoïdes, la présence de groupements hydroxyles libres offre une possibilité de séparation par chromatographie d'adsorption. Ce gel présentant de plus une bonne résistance

chimique et mécanique, a été très largement utilisé pour l'étude des proanthocyanidols (Boukharta *et al.*, 1994 ; Sun *et al.*, 1999; Cadot *et al.*, 2006).

Le fractionnement a été réalisé suivant la méthode décrite par Cadot *et al.* (2006), (2012). 2ml d'extrait brut de pellicules et de pulpes ont été déposés sur le Fractogel en tête de la colonne après avoir conditionné la colonne avec 40ml du mélange éthanol/eau/TFA (110:90:0:01). L'élution des différents monomères (acides phénoliques, les flavonols et les anthocyanes) a été effectuée avec 30ml du solvant précédent à un débit de 1 ml/min ; cette fraction n'est pas gardée. Une deuxième élution avec 30ml du mélange acétone/eau (60:40) à un débit de 1 ml/min pour récupérer les polymères flavanes-3ols a été réalisée. Ensuite, 300 µl d'étalon interne (EI ; 50 mg de méthyl 4-hydroxybenzoate dans 100 ml du MeOH) ont été rajoutés à la fraction récupérée et à 2ml de chaque extrait de pépins qui n'ont pas été fractionnés du fait qu'ils ne contiennent que des tanins. Les mélanges ainsi obtenus ont été concentrés jusqu'à presque à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif BUCCHI « RE111 », à 35°C, les concentrés ainsi récupérés sont repris avec du méthanol pur dans une fiole de 2 ml et conservés à -80°C pour l'étape suivante (thiolyse et dosage par HPLC).

VI.2.2. Thiolyse

La caractérisation des tanins tels quels par HPLC n'est possible, car les pics ne seraient pas bien séparés, du fait qu'ils soient des molécules complexes à cause de la présence d'un grand nombre d'unités constitutives différentes (catéchine, épicatechine, épicatechine-3-O-gallate...) et de leur degré de polymérisation. Une dépolymérisation de ces molécules est nécessaire pour l'obtention de unités constitutives et terminales.

Les réactions de dépolymérisation en milieu acide en présence d'un agent nucléophile fort « l'alpha-toluène thiol », permettent d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure des tanins condensés (Rigaud, 1991). En effet, lors de la thiolyse, le Toluène- α -Thiol rompt les liaisons inter-flavanoliques C-C des tanins. Cette réaction libère ainsi toutes les sous-unités flavan-3-ol inférieures terminales qui restent intactes sous la forme de monomères tandis que les unités intermédiaires et supérieures réagissent avec l'agent nucléophile pour former des dérivés thio-éther substitués en position 4 (flavanyls 4-benzyl thio-éther ou 4-flavanylcations) (Fig. 14). La stéréochimie de toutes les unités est conservée de même que les éventuels substituants tels que les galloylés.

La thiolyse a été réalisée selon la méthode décrite par Brossaud *et al.* (1999). 120µl d'extrait destiné à la thiolyse (extraits fractionnés des pellicules et des pulpes, ainsi que des extraits concentrés des pépins contenant l'EI) filtrés à 0,45µm ont été mélangés avec 120 µl du réactif de

thiolyse (benzylmercaptan à 2,5%) dans un flacon HPLC. Les flacons scellés sont immergés dans un bain-marie à 90°C pendant 2 min. Ensuite, la réaction est stoppée immédiatement avec de l'eau froide. Cette méthode d'analyse permet la distinction entre les unités terminales libérées sous forme de flavan-3-ols et les unités intermédiaires et supérieures libérées sous forme de benzylthioethers. L'HPLC permet d'identifier et de quantifier les teneurs et les proportions de chacune des unités constitutives et d'estimer ainsi le degré de polymérisation moyen (DPM) des tanins condensés qui correspond au rapport de toutes les unités (terminales, intermédiaires et supérieures) sur le nombre d'unités terminales.

$$\text{DPM} = \frac{\sum \text{toutes les unités (terminales + intermédiaires + supérieures)}}{\sum \text{unités terminales}}$$

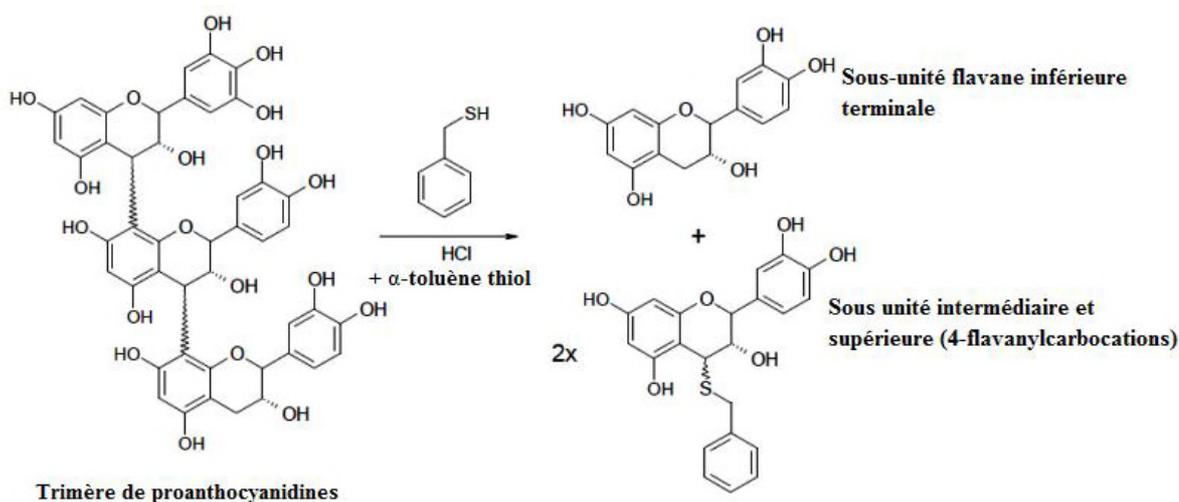


Figure 14. Fractionnement d'un trimère par thiolyse (Cadot, 2006).

VI.2.3. Analyse par HPLC

Le matériel chromatographique est le même que celui utilisé pour l'analyse des anthocyanes, des flavonols et les acides phénols.

Les analyses ont été effectuées sur les extraits thiolysés et non thiolysés suivant les conditions décrites par Brossaud *et al.* (1999) et Cadot *et al.* (2012). Les éluants utilisés sont constitués des solutions A (acide acétique/eau à 25:975, v/v) et B (acétonitrile /eau / acide acétique à 800:175: 25, v/v), dont les gradients adoptés sont indiqués dans le tableau VIII. Un volume d'injection de 20µl de chaque extrait avec un débit de 1ml/min et une température de l'atmosphère ambiante ont été adoptés. Le dosage a duré 38 min. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm. Toutes les analyses ont été effectuées en double.

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-Vis par comparaison avec des chromatogrammes références dans les mêmes conditions de travail. Les données quantitatives ont été obtenues pour chaque unité terminale après calibration avec un composé commercial. Pour les unités d'extension, les données quantitatives ont été obtenues après le calcul du coefficient d'absorption des composés purifiés correspondants qui ont été obtenues comme décrit par Souquet *et al.* (1996) et après examen de la quantification de l'étalon interne dans le chromatogramme. Les résultats sont exprimés en mg/kg d'échantillon en « épicatechine » (mg EEC/Kg échantillon).

Tableau IX: Gradient linéaire utilisé pour la séparation des flavan-3-ols.

Temps (min)	% A	% B
0	95	5
3,5	88,5	11,5
5	80	20
23	50	50
35	40	60
28	5	95
32	5	95
35	95	5
38	95	5

VII. Evaluation du pouvoir antioxydant

VII.1. Pouvoir antiradicalaire DPPH^{*}

L'activité antiradicalaire des six échantillons déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical diphenyl picryl-hydrazyl (DPPH^{*}), par don d'atomes d'Hydrogènes ou d'électrons (Molyneux, 2004).

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui de Milardović *et al.* (2006). Il consiste à mélanger 290µl de la solution DPPH (6 x 10⁻⁵ mM) avec 10µl ml de chaque extrait dans une microplaque à 96 puits. La mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH^{*} traduite par une décoloration a été faite à 515 nm après incubation de 30 min. les résultats sont exprimés en mg EAA/g MS pour les pépins et les pellicules et en mg EAA/100g MF pour pulpes en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe).

VII.2. Pouvoir antiradicalaire ABTS^{*+}

Le radical préformé 2,2'azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS^{*+} est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. La

formation du radical $ABTS^{*\cdot}$ se traduit par l'apparition d'une coloration verte bleue intense. En présence d'un donneur de H^{\cdot} , le passage du radical $ABTS^{*\cdot}$ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 734nm.

Le radical cation $ABTS^{*\cdot}$ est généré en mélangeant, à volume égal, une solution de 3mM de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) et une solution d' $ABTS^{*\cdot}$ à 8 mM, le tout a été conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante durant 16h avant utilisation. La solution a été diluée avec du méthanol 50% pour obtenir une absorbance de $0,7\pm 0,02$ à 734nm. 2,9ml de cette solution fraîchement préparée ont été ajoutés à 0,1ml d'extrait et la lecture est faite à 734nm après 30 min (Awika *et al.*, 2003). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Trolox par g de matière sèche (mg ET/g MS) pour les pépins et les pellicules et en mg équivalent de Trolox par 100g de matière fraîche (mg ET/ 100g MF) pour les pulpes en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe).

VII.3 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur se base sur la réaction d'oxydoréduction, dont la réduction du chlorure ferrique ($FeCl_3$) en chlorure ferreux ($FeCl_2$) en présence d'un agent chromogène : le Ferricyanure de Potassium [$K_3Fe(CN)_6$] en milieu acidifié par l'acide trichloracétique. La forme réduite donne une couleur verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur (Ozsoy *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008)..

Le pouvoir réducteur des différents extraits a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) rapportée par Kumar *et al.* (2005). 1ml de chaque extrait a été mélangé avec 2,5ml de tampon phosphate (0,2M; pH 6,6) et 2,5ml de Ferricyanure de Potassium (1%). Après incubation à 50°C/20min, 2,5ml d'acide trichloracétique (10%) ont été additionnés au mélange et centrifugés à 5000g pendant 10 min. 2,5ml d'eau distillée ont été ajoutés à 2,5ml du surnageant, puis 0,5ml de chlorure ferrique (0,1%) ont été additionnés au mélange et l'absorbance a été mesurée à 700nm. Le pouvoir réducteur des extraits est exprimé en mg équivalent d'acide ascorbique par g de matière sèche (mg EAA/g MS) pour les pépins et les pellicules et en mg équivalent d'acide ascorbique par 100g de matière fraîche (mg EAA/100g MF) pour les pulpes (Annexe).

VII.4. Pouvoir chélateur du fer

La capacité chélatrice des différents extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine après incubation des échantillons avec le fer divalent

selon la méthode de Wang *et al.* (2008). Un volume de 500 µl d'extrait a été additionné de 50 µl de chlorure ferreux (2 mM) et 1,6 ml d'eau distillée. Le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 5 min ; 100 µl de ferrozine (5 mM) ont été ajoutés au mélange réactionnel; après 5 min d'incubation, l'absorbance du complexe Fe²⁺-ferrozine a été mesurée à 562 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage selon l'équation suivante :

$$\text{Capacité chélatrice (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

A₀ : Absorbance en absence de l'extrait ;

A₁ : Absorbance en présence de l'extrait;

A₂ : Absorbance sans ferrozine.

VIII. Analyses statistiques

Toutes les données sont représentées sous forme d'une moyenne ± l'écartype et sont calculées à l'aide du programme Microsoft Office Excel 2007. Pour la comparaison des résultats, l'analyse de la variance (ANOVA/MANOVA, Test LSD, Least Significant Difference ; logiciel : STATISTICA 5.5) est utilisée. L'étude des corrélations est réalisée par le module de statistique élémentaire du logiciel STATISTICA 5.5. et le degré de signification est pris à $p < 0,05$. Le logiciel JMP 10 (SAS, Statistical Analysis System Inc.) est utilisé pour l'analyse des résultats et la génération des graphiques ainsi que les modèles mathématiques de l'optimisation d'extraction des composés phénoliques suivant la méthodologie des surfaces de réponses. Les autres présentations graphiques sont réalisées à l'aide de Microsoft Office Excel 2007.

II. Résultats et Discussion

Chapitre I
Caractérisation
physico-chimiques
des raisins

Chapitre I : Caractérisation physico-chimique des raisins

I. Taux d'humidité

Les résultats du test d'humidité des différentes parties de la baie (la pellicule, la pulpe et les pépins) des six cépages de raisin étudiés sont regroupés dans le tableau X.

Tableau X : Teneurs en humidité des différentes parties de la baie des raisins étudiés (%)

Cépages	Pulpe	Pellicule	Pépins
<i>Ahmar Bou-Amar</i>	78,65 ± 0,27 ^c	54,17 ± 0,29 ^f	13,24 ± 0,10 ^d
<i>Italia</i>	77,98 ± 0,18 ^c	56,03 ± 0,46 ^e	14,32 ± 0,33 ^c
<i>Muscat Noir</i>	83,65 ± 0,27 ^b	67,65 ± 0,40 ^a	15,68 ± 0,11 ^b
<i>Muscat Blanc</i>	75,91 ± 0,21 ^d	63,47 ± 0,18 ^c	15,54 ± 0,19 ^b
<i>Dattier</i>	83,67 ± 0,35 ^b	58,04 ± 0,45 ^d	14,29 ± 0,82 ^c
<i>Cardinal</i>	84,49 ± 0,38 ^a	64,93 ± 0,34 ^b	18,29 ± 0,61 ^a

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$.

Les résultats du test d'humidité montrent la richesse hydrique de la pulpe des raisins ; les teneurs en eau varient de 75,91% à 84,49%. Quant aux pellicules, elles sont moins riches en eau ; leurs teneurs d'humidité varient de 54,17% à 67,65%. Les pépins montrent des teneurs en eau plus faibles en comparaison à celles des pulpes et des pellicules allant de 13,24% à 18,29%. L'analyse statistique révèle des différences significatives ($p < 0,05$) entre le taux d'humidité des différentes parties du même cépage.

L'analyse statistique indique que la pulpe du cépage *Cardinal* est la plus riche en eau suivie du *Muscat Noir* et du *Dattier* avec des teneurs significativement similaires (83,65% et 83,67%, respectivement) puis vient en troisième groupe les cépages *Ahmar Bou-Amar* et *Italia* et en dernier le *Muscat Blanc*. Selon Valnet (2001), la teneur en eau dans la pulpe des raisins est de 72,92% à 84,32%. Lafka *et al.* (2007), ont noté une teneur en eau de 73,6% dans des raisins de cuve. D'après Lago-Vanzela *et al.* (2011), la teneur en eau de la variété *Bordô* (*Vitis labrusca*) est de 66,48%. Les résultats obtenus dans la présente étude concordent avec ceux trouvés par ces auteurs.

Le taux d'humidité des pellicules oscille d'un cépage à l'autre, les différences sont significatives ($p < 0,05$). Les teneurs en eau de la pellicule des différents cépages sont classées selon l'ordre décroissant suivant : *Muscat Noir* (67,65%), *Cardinal*, *Muscat Blanc*, *Dattier*, *Italia* et *A. Bou-Amar* (54,17). Ces valeurs sont relativement similaires à celle obtenue par Butkhup *et al.* (2010) qui ont trouvé 58,76% dans le cépage *Shiraz* cultivé à Thaïlande. D'autres auteurs, enregistrent des teneurs plus faibles. Rebelló *et al.* (2013), enregistrent une valeur de 46% dans le cépage *Violeta* et Lago-Vanzela *et al.* (2011), ont obtenu une teneur en eau de 30%, pour la variété *Bordô* (*Vitis labrusca*).

Statistiquement, nous pouvons classer les teneurs en humidité des pépins des différents cépages, suivant l'ordre décroissant, comme suite: *Cardinal* > *Muscat Blanc* = *Muscat Noir* > *Dattier* = *Italia* > *A. Bou-Amar*. Les teneurs en eau des pépins retrouvés dans le présent travail appartiennent à l'intervalle obtenu par Seyed *et al.* (2009) dans leur étude de l'effet des propriétés physiques des pépins (cépage *Shahrodi*) sur la teneur en eau (5,21 à 16,55%). Cependant, elles sont supérieures de celles enregistrées par Sivritepe *et al.* (2008) qui varient de 10,01 à 11,60% et de celles obtenues par Yemis *et al.* (2008), qui ont enregistré des valeurs de matières sèches des pépins dans 12 cépages allant de 92,69 à 95,40% qui correspondent à 7,31 et 4,6% en teneurs en eau. D'autre part, Butkhup *et al.* (2010) ont trouvé 45,49% dans le cépage *Shiraz*, cette valeur est largement supérieure à celles trouvées dans le présent travail. Les différences constatées entre les résultats obtenus dans la présente étude et ceux rapportés par ces auteurs, peuvent être liées aux conditions environnementales différentes (Tural et Koca, 2008).

Selon Ercisli (2007), l'altitude est le principal facteur responsable de la variation de la matière sèche. La différence peut également être due à l'effet variétal. En effet, Seyed *et al.* (2009), ont démontré une corrélation positive et significative entre la teneur en eau des pépins ainsi que leurs tailles ; plus la taille augmente plus le taux d'humidité est élevé.

II. pH et acidité

Les résultats de l'analyse du pH et de l'acidité du jus des différents échantillons étudiés sont regroupés dans le tableau XI.

Les valeurs du pH de différents cépages étudiés varient entre 3,68 et 3,81. L'étude statistique montre que les valeurs du pH sont différentes significativement ($p < 0,05$).

Tableau XI : Caractéristiques physico-chimiques des jus des raisins étudiés

Variétés	pH	Acidité (g/L)	Degré Brix %	Degré Brix/ Acidité
<i>Ahmar Bou-Amar</i>	3,68 ± 0,01 ^e	3,47 ± 0,14 ^b	17,28 ± 0,00 ^c	49,69 ± 1,97 ^b
<i>Italia</i>	3,76 ± 0,01 ^c	4,13 ± 0,12 ^a	17,06 ± 0,02 ^d	41,33 ± 1,45 ^d
<i>Muscat Noir</i>	3,59 ± 0,01 ^f	4,05 ± 0,13 ^a	20,56 ± 0,04 ^a	50,82 ± 1,73 ^b
<i>Muscat Blanc</i>	3,73 ± 0,01 ^d	3,28 ± 0,06 ^b	17,27 ± 0,10 ^c	53,51 ± 0,95 ^a
<i>Dattier</i>	3,81 ± 0,01 ^a	4,13 ± 0,06 ^a	18,02 ± 0,07 ^b	43,65 ± 0,96 ^c
<i>Cardinal</i>	3,79 ± 0,01 ^b	4,10 ± 0,09 ^a	18,16 ± 0,13 ^b	44,29 ± 1,29 ^c

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$.

Les valeurs du pH obtenues pour les différents cépages indiquent que le *Dattier* possède le pH le plus élevé (3,81), suivi du *Cardinal* (3,79), d'*Italia* (3,76), du *Muscat Blanc* (3,73), d'*Ahmar Bou-Amar* (3,68) et enfin du *Muscat Noir*. Baydar *et al.* (2006), en étudiant quelques variétés de raisins turcs, ont trouvé que les valeurs du pH changent de 3,53 à 3,83. Vial *et al.* (2005), ont obtenu des pH variant entre 3,2 et 3,7. Rolle *et al.* (2015), ont obtenu des valeurs de pH entre de 3,69 et 3,73 avec un effet non significatif, dans leur étude sur l'effet du diamètre de la baie de raisin sur les caractéristiques physicochimiques de la variété *Muscat Noir (Hambourg)* cultivée en Italie. Rebello *et al.* (2013), ont noté une valeur de 3,75 pour la variété *Violeta*. Les résultats du présent travail sont en accord avec ceux obtenus par les auteurs cités ci-dessus.

Les différences trouvées entre les pH des échantillons étudiés peuvent être attribuées aux variétés et au degré de maturité des échantillons. Selon Attia (2007), le pH final à la récolte dépend du cépage, du porte-greffe, de la nutrition potassique et de la température.

III. Acidité titrable

Les résultats de l'acidité titrable (tableau XI) montrent que les cépages *Italia* et *Dattier* présentent l'acidité la plus élevée avec une valeur de 4,13 g/l. *Ahmar Bou-Amar* ainsi que le *Muscat Blanc* présentent l'acidité la plus faible (3,28 et 3,47, respectivement). L'analyse statistique a permis de classer les différents cépages selon leur acidité suivant l'ordre décroissant suivant : *Cardinal* = *Dattier* = *Italia* = *Muscat Noir* > *Ahmar Bou-Amar* = *Muscat Blanc*.

Plusieurs auteurs ont rapporté l'acidité des jus de raisins. Dans une étude effectuée par Orak (2007) sur 16 cépages, ils ont obtenu des valeurs en acidité titrable variant de 3,31g/L à 9,53g/L.

Vial *et al.* (2005), ont trouvé des résultats allant de 4 et 10 g/L. Selon Baydar (2006), l'acidité titrable varie entre 4,2 et 6,3 g/L (en étudiant trois cépages). Moldovan *et al.* (2015), ont noté une valeur en acidité de 5,54 g/L pour le cépage *Merlot* cultivé en Roumanie. De même, Rolle *et al.* (2015), ont enregistré des valeurs en acidité titrable variant de 4,11 et 4,41 avec un effet non significatif dans la variété *Muscat Noir (Hambourg)* cultivé en Italie. Les résultats de la présente étude concordent avec les travaux cités. Rebello *et al.* (2013), ont noté une valeur de 11,13 pour la variété *Violeta*, cette valeur est supérieure à celles trouvées dans le présent travail.

IV. Degré Brix

Selon les résultats illustrés dans le tableau XI, le degré Brix des six variétés étudiées varie significativement de 17,06 à 20,56% pour les variétés *Italia* et *Muscat Noir*, respectivement ($p < 0,05$).

Les études réalisées par Geroyiannaki *et al.* (2007) sur différentes variétés de raisins, rapportent que le Brix des raisins noirs et blancs varie entre 16,4 et 19,5 %. Selon Baydar (2006), le brix de trois cépages varie entre 18,00 et 23,25%. Rebello *et al.* (2013), ont noté une valeur de 19,75 % pour la variété *Violeta*. Les résultats relatifs aux Brix des jus des six variétés de raisins locales concordent avec ceux obtenus par les travaux cités ci-dessus.

Selon Topalović *et al.* (2012), le brix augmente au cours de la maturation. Ces auteurs ont démontré une augmentation des valeurs du brix de 13,0 à 17,2 et de 11,7 à 17,6 pour les cépages *Alphonse Lavalée* et *Cardinal*, respectivement, cultivés en Sibérie. Le résultat du brix obtenu dans le présent travail pour le cépage *Cardinal* est supérieur à celui obtenu par ces derniers auteurs, cette différence peut être expliquée par l'origine géographique et la composition du sol et la température du climat. Selon Janick (1992), la position du fruit sur l'arbre peut influencer la concentration en sucres; l'exposition des fruits à la lumière, induit une augmentation de la teneur en sucres.

V. Indice de maturité

Le rapport sucres/acidité constitue un indicateur de maturité technologique et de consommation (Moldovan *et al.*, 2015 ; Rolle *et al.*, 2015). Il est considéré comme un indice de qualité utilisé pour indiquer l'aigreur des fruits et des jus. Ainsi, un rapport élevé en sucres/acidité est caractéristique d'un fruit ou d'un jus de fruit sucré et peu aigre. Ce rapport augmente au cours de la maturation du fruit ; durant le processus de maturation, les acides sont

dégradés, le contenu en sucres augmente et le rapport sucres/acidité prend une valeur plus élevée (Guelfat-Reich et Safran, 1971 ; Topalović et Mikulić-Petkosek, 2010 ; Topalović *et al.*, 2011 ; Topalović *et al.*, 2012).

Selon Topalović et Mikulić-Petkosek (2010), le rapport sucres/acidité augmente de 26,09 à 62,56 en 2007 pour le cépage *Cardinal* cultivé en Slovénie au cours de la maturation. Quant à Topalović *et al.* (2011), indiquent que le rapport sucres/acidité augment de 19,30 à 53,86 en 2008 et de 13,43 à 22,64 en 2009 pour le même cépage durant le processus de la maturation. Ces auteurs ont expliqué cette différence entre ces rapports obtenus d'une année à une autre, pour le même cépage, par la sensibilité des acides organiques à la température. En effet, les températures moyennes de la période 21 juin au 13 du mois de juillet de 2008 et de 2009 sont respectivement (la période de récolte) : 29,1°C et 23,1°C ; la teneur en acide malique est plus élevée à 23,1°C.

Selon OIV (2008), le raisin est considéré mûr si le rapport sucres/acidité est supérieur à 20 ou si le Brix est supérieur ou égal à 16. Selon ces critères, toutes les variétés analysées dans la présente étude sont mûres.

Chapitre II
Optimisation de
l'extraction des
composés phénoliques

Chapitre II : Optimisation de l'extraction des composés phénoliques

Les polyphénols sont distribués différemment dans les trois parties de la baie de raisin, ainsi le contenu quantitatif et qualitatif en ces composés est spécifique pour chaque fraction leur extraction serait différente d'une matrice à une autre d'où la nécessité d'établir un protocole d'extraction pour chacune d'elle.

L'objectif de l'étape d'extraction des polyphénols à partir de la matrice végétale est de libérer ces composés à partir des structures vacuolaires où ils se trouvent, par la rupture du tissu végétal ou par le phénomène de diffusion. La méthode d'extraction doit permettre une extraction maximale des composés désirés tout en évitant au maximum leurs modifications chimiques. Plusieurs paramètres peuvent influencer l'extraction des ces composés à savoir leur nature chimique, la méthode d'extraction utilisée, le solvant ainsi que le temps et la température d'extraction ; en outre, il est difficile de développer une technique d'extraction convenable pour extraire tous les composés phénoliques d'un échantillon (Naczka et Shahidi, 2006 ; Chirinos *et al.* 2007).

I. Sélection de la nature du solvant

Les polyphénols sont des composés polaires, l'extraction se fait généralement avec un solvant organique mélangé avec de l'eau. Il n'existe pas un solvant qui permet d'extraire tous les composés phénoliques d'un échantillon, car la polarité de ces composés est variable. L'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'eau et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques

Des analyses préliminaires ont été effectuées pour déterminer le solvant d'extraction approprié pour chaque matrice. L'efficacité de l'éthanol, du méthanol, de l'acétone et de l'eau sur l'extraction des composés phénoliques totaux des pépins, de la pellicule ainsi que la pulpe de raisin de deux cépages (*Ahmar Bou-Amar* et *Italia*), a été comparée. Les résultats sont présentés dans le Tableau XII.

L'analyse statistique révèle des différences significatives ($p < 0,05$) entre les teneurs en polyphénols totaux des pépins en utilisant différents solvants d'extraction, quel que soit le cépage étudié, excepté pour le cépage *Italia*, où aucune différence n'a été trouvée entre l'efficacité de l'éthanol et du méthanol.

Tableau XII : Effet de la nature du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux à partir des extraits de pépins, pellicule et pulpe de raisin de deux cépages.

Solvants	PT des extraits de pépins (mg EAG /g MS)		PT des extraits de pellicules (mg EAG/g MS)		PT des extraits de pulpe (mg EAG/100 g MF)	
	AB	IT	AB	IT	AB	IT
Eau	57,56±0,23 ^c	75,94 ±0,98 ^b	07,58 ± 0,83 ^d	12,53 ± 0,94 ^d	43,55 ±0,69 ^d	44,97 ± 1,91 ^d
Ethanol 50%	86,51±5,36 ^a	101,43 ±1,08 ^a	20,61 ± 1,64 ^b	23,79 ± 0,50 ^b	49,77 ±1,04 ^c	51,52 ± 1,11 ^c
Méthanol 50%	69,18±1,41 ^b	103,61 ±1,14 ^a	13,09 ± 0,79 ^c	17,06 ± 0,78 ^c	61,50 ± 2,64 ^b	62,14 ± 0,96 ^b
Acétone 50%	38,92±0,68 ^d	51,76 ±1,93 ^c	27,90 ± 0,39 ^a	31,15 ± 0,56 ^a	72,06 ± 0,66 ^a	80,62 ± 2,44 ^a

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d$. AB : Ahmar Bou-Amar, IT : Italia, PT : Polyphénols Totaux.

Les teneurs les plus élevées ont été détectées dans l'extrait éthanolique pour le cépage *Ahmar Bou-Amar* (86,51 mg/gMS) et dans les extraits éthanolique (101,43 mg/gMS) et méthanolique (103,61 mg/gMS) pour le cépage *Italia* qui présente des teneurs similaires statistiquement ($p > 0,05$), suivi par le solvant aqueux puis en dernier l'acétone avec des teneurs de 38,92 et 51,76 mg/gMS pour *Ahmar Bou-Amar* et *Italia*, respectivement.

Quant aux pellicules, les mêmes résultats ont été observés quel que soit le cépage en question. L'étude statistique montre que la teneur en composés phénoliques des extraits de pellicules est significativement ($p < 0,05$) affectée par le type du solvant utilisé. En effet, le solvant qui extrait le mieux les polyphénols totaux à partir des pellicules c'est l'acétone avec des teneurs de 27,90 et 31,15 mg/g MS pour *Ahmar Bou-Amar* et *Italia*, respectivement. Suivi par l'éthanol puis par le méthanol et enfin l'eau avec des teneurs faibles de 5,58 et 12,53 mg/g MS pour *Ahmar Bou-Amar* et *Italia*, respectivement.

Concernant les pulpes, l'étude statistique montre aussi que la teneur en composés phénoliques des extraits de pulpes, quel que soit le cépage étudié, est significativement ($p < 0,05$) affectée par le type du solvant utilisé. La teneur la plus élevée est obtenue avec l'extrait acétonique à 50% avec une teneur de 72,06 et 80,62mg/100g MF pour *Ahmar Bou-Amar* et *Italia*, respectivement, suivie par les extraits méthanoliques, éthanoliques et aqueux avec les teneurs de 61,50, 49,77 et 43,55 mg /100g MF, respectivement pour le cépage *Ahmar Bou-Amar* et de 62,14, 51,52 et 44,97 mg /100g MF, respectivement pour le cépage *Italia*. L'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe des raisins présente l'ordre décroissant suivant : l'acétone > le méthanol > l'éthanol > l'eau.

Par conséquent, selon les résultats obtenus dans la présente étude, l'éthanol a été choisi pour être le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques à partir des pépins et l'acétone a été sélectionné comme le solvant approprié pour extraire le maximum de composés phénoliques à partir des pellicules et des pulpes. Ces résultats sont en accord avec des résultats déjà publiés. En effet, l'éthanol a été utilisé par de nombreux chercheurs pour extraire des composés phénoliques à partir des baies de raisins, des pépins, des pellicules et/ou de marcs de raisin (Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012; Katalinic *et al.*, 2010; Pourali *et al.*, 2014; Spigno *et al.*, 2007). Yilmaz et Toledo (2006), ont utilisé l'acétone aqueux. Kennedy *et al.* (2002) ont extrait les composés phénoliques à partir de la pellicule de raisin avec de l'acétone aqueux 66%. Cadot *et al.* (2011, 2006), ont utilisé différents solvants pour extraire les polyphénols à partir des

pépins et des pellicules de raisins : acétone/méthanol/H₂O/TFA (50:15:35:0.05) pour la pellicule et acétone/H₂O (60:40) pour les pépins.

Les résultats montrent que la nature du solvant approprié diffère selon la matrice végétale étudiée quel que soit le cépage. Ces variations peuvent être attribuées à la différence de la composition chimique spécifique pour chaque matrice ainsi qu'à la différence de solubilité de leurs composés phénoliques dans les solvants d'extraction et à leur degré de polymérisation. En effet, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité des solvants utilisés et le choix de ces derniers dépend du nombre de groupes hydroxyle inclus dans les structures de leur composition (Naczki et Shahidi, 2006 ; Chethan et Malleshi, 2007). Pour cela, il est difficile de préconiser un solvant universel pour l'extraction de tous les composés phénoliques et des étapes additionnelles peuvent être exigées pour séparer les composés phénoliques des substances non phénoliques tels que les terpènes, les lipides et les chlorophylles (Naczki et Shahidi, 2006).

II. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par la méthodologie des surfaces de réponses

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques, par deux procédés d'extraction, à partir des trois fractions de la baie de la variété *d'Ahmar Bou-Amar* a été étudiée en utilisant la méthodologie de surfaces de réponses (MSR). Cette méthode a pour but d'obtenir un maximum d'information sur le phénomène étudié en un minimum d'expériences (Goupy et Creighton, 2006). La méthodologie de surface de réponse est une méthode visant à déterminer les variations d'une réponse vis-à-vis des facteurs d'influences significatives. Elle permet en effet d'établir une relation entre les variables d'entrée (facteurs) et les variables de sortie (réponses) par des modèles mathématiques (Goupy, 2006 ; Goupy et Creighton, 2006). Cette technique permet aussi d'étudier l'influence des facteurs et les interactions entre ces paramètres et de définir les paramètres optimaux donnant une réponse maximale (Goupy et Creighton, 2006 ; Huang *et al.*, 2010).

Les plans utilisés dans le cadre d'une étude de MSR sont des plans quadratiques « les plans centraux composites » (Box-Wilson) ou les plans de Box-Behnken. La modélisation de la réponse est réalisée à l'aide de techniques de régression permettant de relier une réponse « y » à un ensemble de facteurs « x_i » soit : $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$. Dans la présente étude, l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir des trois fractions étudiée par la MSR est fondée sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques suivant les modèles de Box-

Behnken et de plan composite centré en étudiant deux méthodes d'extraction : Extraction par macération conventionnelle et extraction assistée par microondes, respectivement.

II.1. Extraction par macération conventionnelle (EMC)

II.1.1. Construction du plan expérimental

La procédure expérimentale et les différentes réponses de chaque extrait des pépins, de la pellicule et de la pulpe du cépage *Ahmar Bou-Amar* sont représentées dans le tableau (XII). Le modèle présente 15 expériences au total. Des répétitions au centre du domaine expérimental sont effectuées. Ces expériences répétitives permettent d'évaluer l'erreur expérimentale des essais et la reproductibilité du procédé d'extraction (Goupy et Creighton, 2006).

Suite aux résultats obtenus dans l'étude de l'effet de la nature du solvant sur l'extraction des composés phénoliques, l'extraction de ces derniers a été faite par le solvant approprié pour chaque matrice ; l'éthanol pour les pépins et l'acétone pour la pellicule et la pulpe. L'optimisation et l'évaluation de la performance d'extraction des composés phénoliques, à partir des trois parties de la baie de raisin étudié, par EMC ont été réalisées à l'aide d'une méthodologie expérimentale statistique. Après avoir réalisé une étude préliminaire, trois variables ont été retenues comme pertinentes : L'effet de la concentration du solvant, l'effet du ratio échantillon/solvant et celui du temps d'extraction.

Les réponses obtenues pour chaque matrice végétale sont représentées dans le tableau (XII). Les réponses en PT sont exprimées en mg EAG/g MS pour les pépins et la pellicule et en mg EAG/100g MF pour la pulpe. Des variations de réponses en fonction des niveaux des facteurs impliqués dans l'expérience ont été observées pour chaque matrice; il est également à noter que les expériences ont été effectuées de façon aléatoire afin d'éviter toute influence de l'expérimentateur sur la réponse du plan expérimental.

Les résultats montrent que le taux d'extraction des composés phénoliques varie de 87,99 à 95,97 mg EAG/g MS, de 33,19 à 39,14 EAG /g MS et de 30,18 à 89,06 mg EAG/100gMF Ceci confirme l'influence des paramètres étudiés (temps, ratio échantillon/solvant et la concentration du solvant) sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques ce qui est similaire aux résultats retrouvés par plusieurs auteurs (Jokić *et al.*, 2010 ; Chew *et al.*, 2011 ; Liu *et al.*, 2016).

Les modèles prédits ont été générés par les équations polynomiales du second degré pour décrire la relation empirique entre la teneur en PT des pépins (Y_1), de la pellicule (Y_2) et de la

pulpe (Y_3) et les conditions opérationnelles (X_1 : concentration du solvant, X_2 : temps d'extraction et X_3 : rapport échantillon / solvant) en termes de valeurs codées. Les modèles mathématiques ont été simplifiés par l'élimination des termes statistiquement insignifiants sur la réponse.

$$Y_1 = 95,65 + 0,46X_1 + 0,35X_2 - 1,78X_3 - 0,87X_2X_3 - 0,54X_1^2 - 2,68 X_2^2 - 2,41X_3^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 38,85 - 0,43X_1 - 0,55X_2 - 1,21X_3 - 0,87X_2X_3 - 1,07X_1^2 - 1,71X_2^2 - 1,19X_3^2 \quad (2)$$

$$Y_3 = 86,15 + 7,06X_1 + 6,04X_2 - 17,20X_3 - 17,23X_1^2 - 25,76 X_2^2 - 13,07X_3^2 \quad (3)$$

Où: Y_1 , Y_2 et Y_3 : Concentration en PT des pépins (mg/g MS), Concentration en PT de la pellicule (mg/g MS) et Concentration en PT de la pulpe (mg/100g MF), respectivement

Avec ces modèles, le calcul de toutes les réponses dans le domaine d'étude sera possible. Il suffit d'attribuer des valeurs aux niveaux X_1 , X_2 et X_3 pour obtenir immédiatement la teneur en polyphénols totaux correspond pour chaque matrice.

II.1.2. Validation des modèles

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) et l'efficacité d'ajustement des modèles (la qualité des modèles) sont présentés dans le Tableau XIII

Les résultats de l'analyse statistique montre que les trois modèles générés sont hautement significatifs ($p < 0,001$), ce qui indique que les modèles sont satisfaisants. Les valeurs R^2 sont proches de 1 pour chaque modèle ($R^2 = 0,9924$; $0,9722$ et $0,9759$ pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement), ce qui indique qu'il existe une bonne corrélation positive et significative entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par les modèles (fig. 15). Aussi, les valeurs des coefficients de détermination ajustés sont élevés ($R^2_{\text{ajustés}} = 0,97$; $0,92$ et $0,93$ pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement), ce qui confirme la haute signification des modèles. La valeur du $R^2_{\text{ajustés}}$ (valeur du R^2 après élimination des coefficients inutiles du model) sera très inférieur à celle de R^2 si le model contient beaucoup de termes inutiles (non significatifs) (Goupy et Ceighton, 2006).

En outre, les valeurs du manque d'ajustement ou défaut d'ajustement (qui est utilisé pour tester le choix du modèle expérimental par rapport au modèle réel) sont pas significatifs ($p > 0,05$), ce qui confirme la validité des modèles générés. Ainsi, tous les résultats obtenus indiquent que les trois modèles appropriés décrits pour chaque matrice pourraient bien être utilisés pour prédire les teneurs en PT des trois matrices étudiées par la technique d'EMC.

Tableau XIII: Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues pour la technique d'EMC.

N°	Variables			Réponses		
	X ₁ -Concentration du solvant (% v/v)	X ₂ -Temps (min)	X ₃ - ratio E/S (mg/ml)	Les Pépins PT (mg EAG /g MS)	La Pellicule PT (mg EAG /g MS)	La Pulpe PT (mg EAG 100/g MF)
1	-1	+1	0	92,06 ± 0,84	36,06 ± 0,70	40,27 ± 0,41
2	+1	0	-1	95,13 ± 1,63	36,89 ± 1,05	88,34 ± 0,17
3	-1	0	-1	93,61 ± 1,36	38,11 ± 0,37	63,51 ± 0,14
4	0	-1	-1	91,38 ± 1,29	36,95 ± 1,70	46,30 ± 1,30
5	0	0	0	95,74 ± 1,09	39,14 ± 0,36	80,82 ± 0,51
6	-1	0	+1	91,01 ± 0,90	35,98 ± 1,17	30,18 ± 0,41
7	0	+1	+1	87,99 ± 0,54	33,19 ± 0,37	33,85 ± 0,34
8	+1	-1	0	92,16 ± 0,78	36,68 ± 0,55	42,57 ± 0,15
9	+1	0	+1	91,01 ± 0,38	35,32 ± 0,31	41,35 ± 1,47
10	0	-1	+1	89,33 ± 1,10	35,70 ± 0,69	32,13 ± 0,51
11	0	+1	-1	93,54 ± 1,48	37,94 ± 1,38	76,98 ± 0,29
12	-1	-1	0	91,71 ± 0,48	36,88 ± 1,13	35,77 ± 0,47
13	+1	+1	0	93,76 ± 0,82	34,63 ± 1,02	54,00 ± 0,32
14	0	0	0	95,97 ± 0,67	38,83 ± 1,84	88,56 ± 0,61
15	0	0	0	95,24 ± 0,78	38,58 ± 0,66	89,06 ± 0,26

(-1), (0), (+1) : Niveaux des différentes variables ; X₁ : Concentration du solvant ; X₂ : Temps d'extraction ; X₃ : Rapport Echantillon/Solvant ; PT : Polyphénols Totaux.

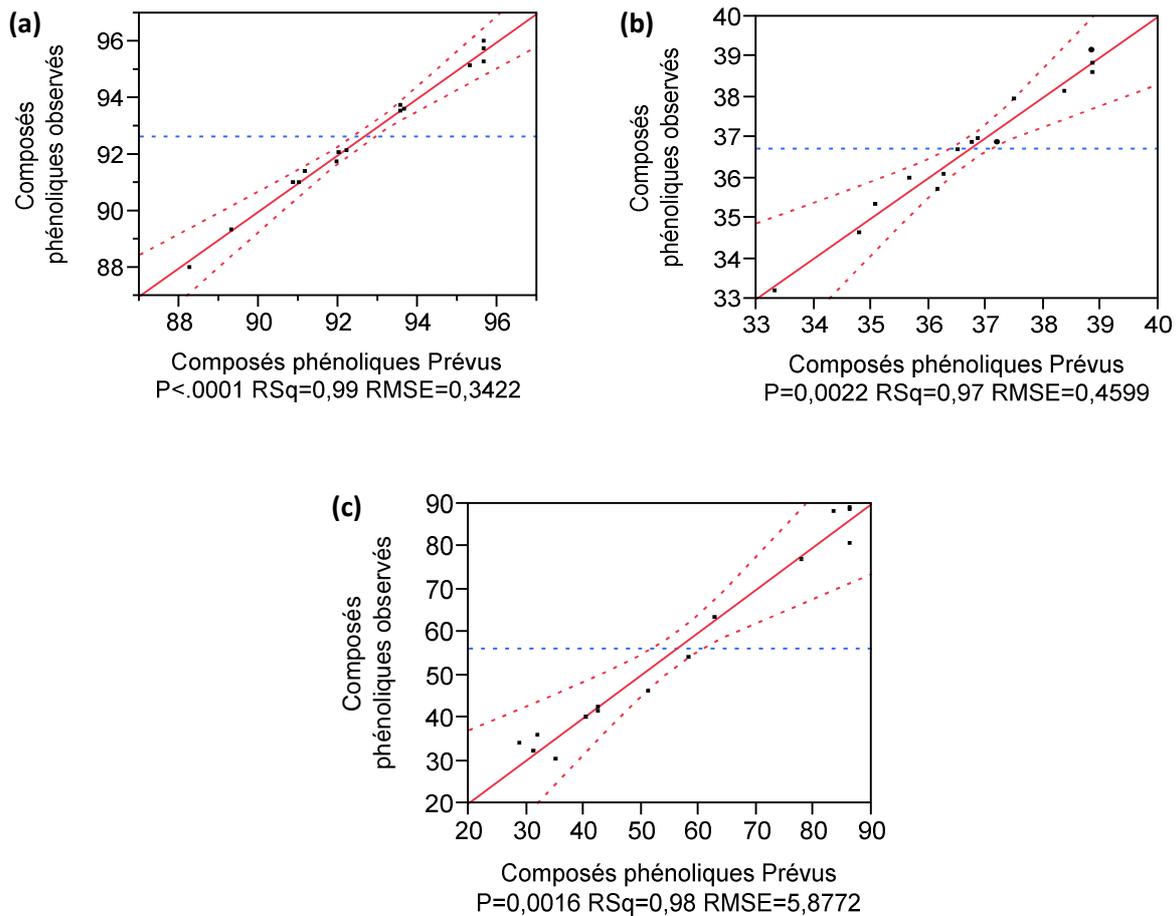


Figure 15 : Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour les composés phénoliques des extraits de pépins (a), de la pellicule (b) et de la pulpe (c), obtenus par EMC.

RMSE : Root Mean Square Error ; racine du carré moyen des résidus ; RSq : R².

II.1.3. Effet des facteurs

L'analyse de la variation de la régression des coefficients consiste à déterminer le degré d'influence des facteurs étudiés (temps d'extraction, concentration du solvant et ratio échantillon/ solvant) sur l'extraction des composés phénoliques à $p < 0,05$. Les résultats de l'analyse sont représentés dans le tableau XIV.

L'analyse de la régression des résultats montre que les trois paramètres (concentration du solvant (X_1), rapport échantillon/solvant (X_2) et le temps d'extraction (X_3)) ont un effet significatif ($p < 0,05$) sur les taux d'extraction des PT à partir des trois matrices étudiées.

Tableau XIV: Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) dans le cas d'EMC.

Source	Pépins				Pellicule				Pulpe			
	Ddl	Somme des carrés	Rapport- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>	Ddl	Somme des carrés	Rapport- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>	Ddl	Somme des carrés	Rapport- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>
Modèle	9	76,9125	72,9768	< 0,0001	9	37,0018	19,4359	0,0022	9	7014,6709	22,5645	0,0016
X ₁ -Solvant	1	1,6718	14,2766	0,0129	1	1,5287	7,2272	0,0433	1	399,3062	11,5602	0,0193
X ₂ -Temps	1	0,9583	8,1834	0,0353	1	2,4088	11,3874	0,0197	1	292,0671	8,4556	0,0335
X ₃ -Ratio	1	25,5628	218,2930	2,56815e-5	1	11,7540	55,5664	0,0006	1	2367,1573	68,5311	0,0004
X ₁ X ₂	1	0,3906	3,3360	0,1273	1	0,3791	1,7926	0,2382	1	12,0095	0,3477	0,5810
X ₁ X ₃	1	0,5779	4,9356	0,0769	1	0,0788	0,3727	0,5681	1	46,5879	1,3488	0,2979
X ₂ X ₃	1	3,0648	26,1724	0,0037	1	3,0548	14,4414	0,0126	1	209,7268	6,0718	0,0569
X ₁ ²	1	1,1126	9,5012	0,0273	1	4,2876	20,2693	0,0063	1	1096,1546	31,7346	0,0024
X ₂ ²	1	26,5220	226,4838	2,34629e-5	1	10,7707	50,9180	0,0008	1	2450,7404	70,9509	0,0004
X ₃ ²	1	21,4407	183,0925	3,94951e-5	1	5,2694	24,9108	0,0041	1	631,0018	18,2680	0,0079
Résidus	5	0,5855			5	1,0576			5	172,7066		
D. d'ajustement	3	0,3060	0,7301	0,6221	3	0,9022	3,8692	0,2122	3	130,0589	2,0331	0,3465
Erreur pure	2	0,2794			2	0,1554			2	42,64775		
Erreur totale	14	77,4980			14	38,0595			14	7187,3775		
		R ² =0,9924				R ² =0,9722				R ² =0,9759		

Ddl : Degrés de liberté ; *D. d'ajustement* : défaut d'ajustement.

Le paramètre rapport échantillon/solvant a un effet le plus dominant, suivi par la concentration du solvant dans le cas des pépins et de la pulpe et par le temps d'extraction dans le cas de la pellicule. Aussi, l'interaction X_2X_3 , possède un effet significatif sur l'extraction des PT dans le cas des pépins et de la pulpe mais n'en pas dans le cas de la pulpe.

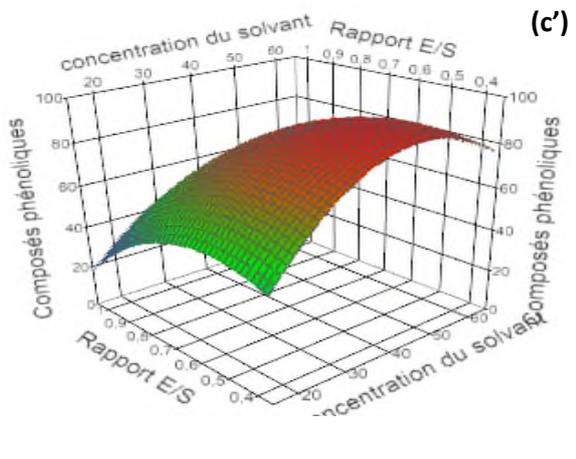
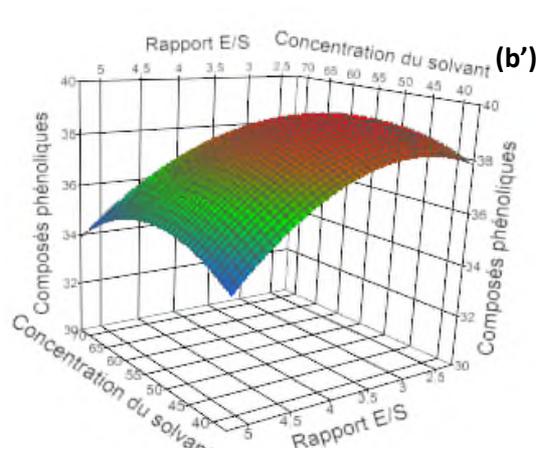
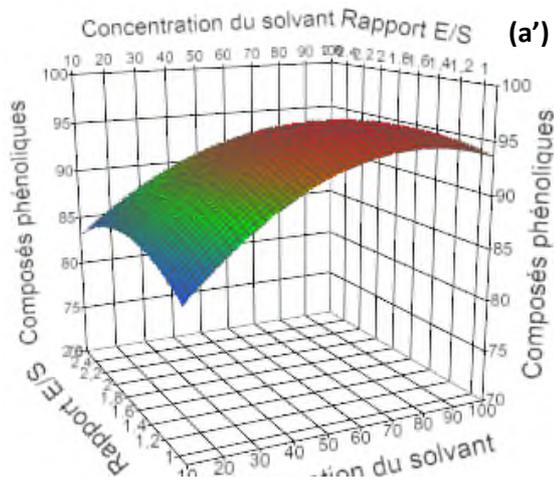
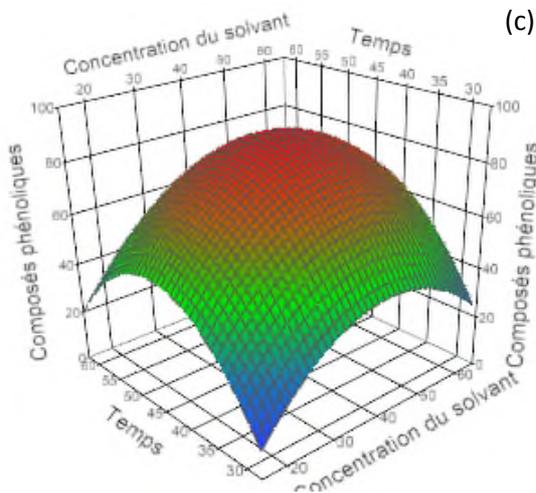
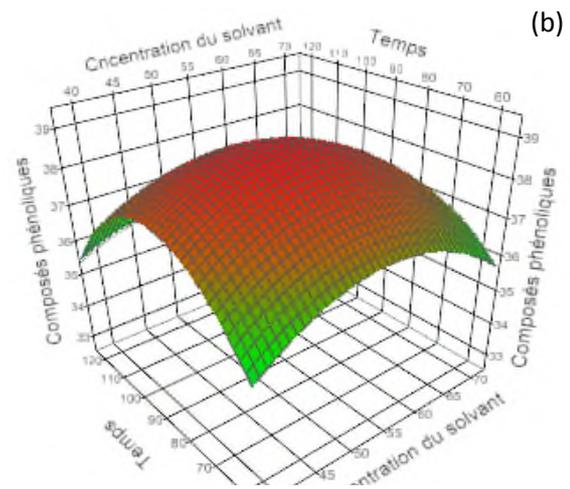
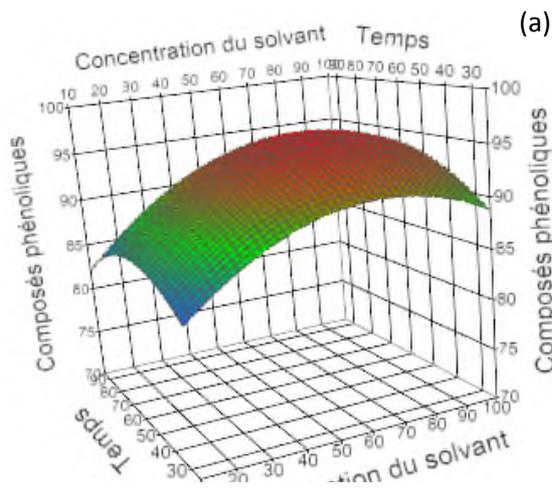
Cependant, les interactions X_1X_2 et X_1X_3 n'ont aucun effet significatif dans les trois cas étudiés. Ces derniers suggèrent une absence totale d'interactions entre les variables dans le domaine expérimental dans les cas appropriés. Tandis que les effets quadratiques des différentes variables sont significatifs dans les trois cas étudiés ($p < 0,05$).

II.1.4. Représentations spatiales et analyse des modèles de surfaces de réponses

Les équations 1 et 3 montrent que la concentration du solvant et le temps d'extraction ont des effets positifs significatifs sur l'extraction des PT des pépins et de la pulpe. Tandis que, le rapport échantillon/solvant, leurs interactions (dans le cas des pépins) ainsi que l'effet quadratique (dans les deux cas) ont un impact négatif. En ce qui concerne la pellicule, l'équation 2, indique que tous les paramètres et leurs interactions ainsi que leur effet quadratique ont un impact négatif important sur l'extraction des PT.

Pour mieux illustrer les effets des différents facteurs, des représentations graphiques des modèles de surfaces de réponses sont générées à partir des modèles mathématiques obtenus dans la présente étude. Dans chaque graphe, deux facteurs varient dans le domaine expérimental et le troisième est fixé à son niveau central (niveau 0).

La figure (16) illustre la représentation spatiale en trois dimensions montrant en figure (16a,b,c) les effets de la concentration du solvant et du temps d'extraction sur l'extraction de composés phénoliques des pépins (a), de la pellicule (b) et de la pulpe (c). Les effets linéaire et quadratique de la concentration du solvant sont bien présentés cela démontre clairement que la polarité du solvant est un paramètre qui exerce un effet très prononcé sur l'extraction des composés phénoliques des trois fractions étudiées ; le choix d'un solvant de polarité adéquate est indispensable pour une extraction efficace de ces substances. Les résultats indiquent, que le rendement en PT augmente avec la concentration de l'éthanol jusqu'à 74%, puis il est resté remarquablement constant. La même remarque a été soulevée pour le cas de la pulpe, en effet les teneurs en polyphénols augmentent avec la concentration de l'acétone jusqu'à 50%, mais après cette concentration les teneurs en PT diminuent légèrement avec un effet non significatif.



Suite de la figure (16)

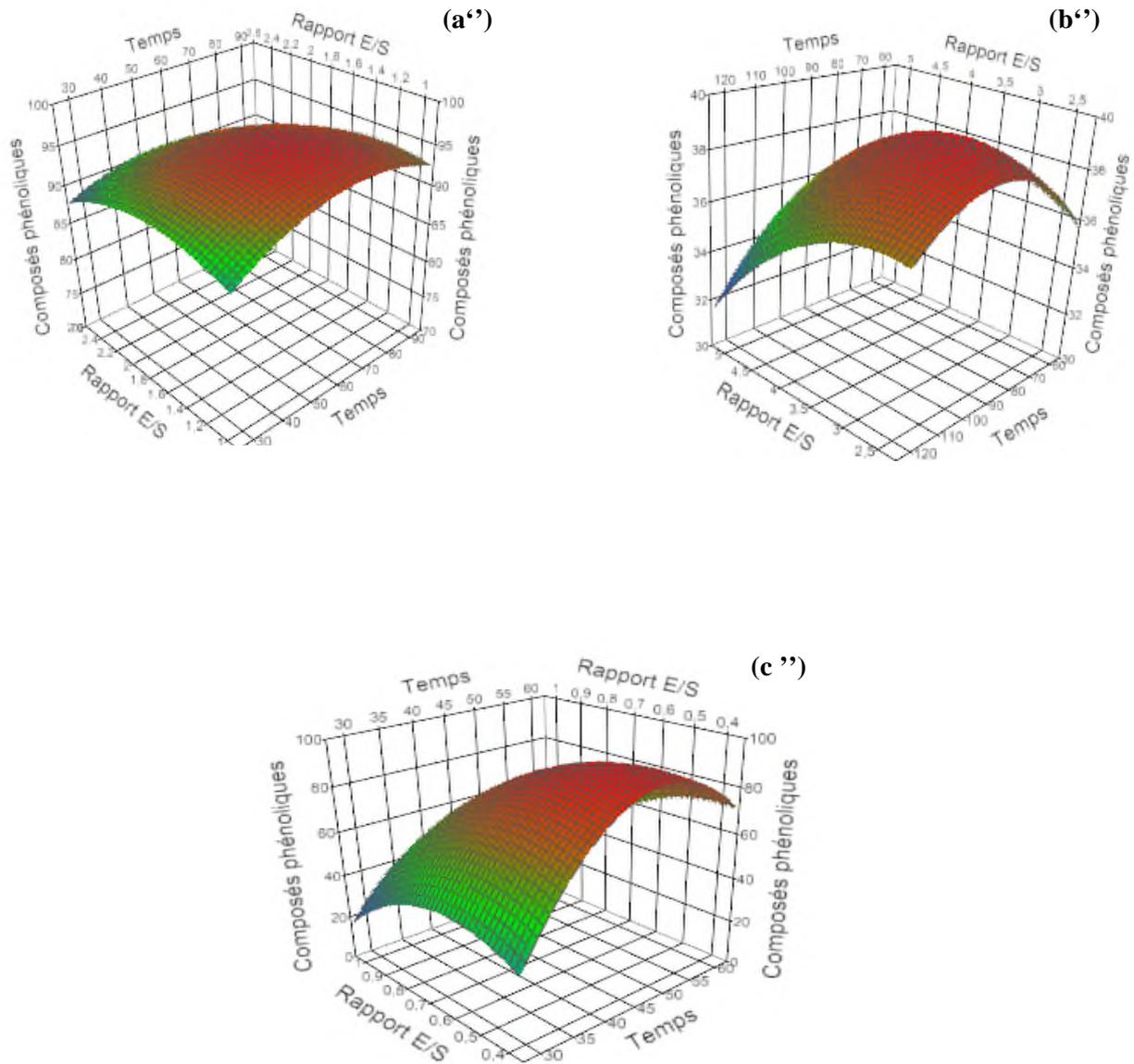


Figure 16: Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses des effets de la concentration du solvant et du temps d'extraction (a : pépins, b : pellicule, c : pulpe), de la concentration du solvant et du rapport échantillon/solvant (a' : pépins, b' : pellicule, c' : pulpe) et du temps d'extraction et du rapport échantillon/solvant (a'' :pépins, b'' : pellicule, c'' : pulpe) sur l'extraction des composés phénoliques des différentes parties de la baie de raisin du cépage *Ahmar Bou-Amar*.

E/S : Echantillon/ Solvant

Quant aux PT des extraits de la pellicule augmentent avec la diminution de la concentration de l'acétone, ainsi les teneurs en PT maximales ont été obtenues avec des concentrations minimales de l'acétone. Des résultats similaires ont été obtenus par Chew *et al.* (2011), l'extrait éthanolique à 40% de *Centella asiatica* contenait plus de composés phénoliques que les extraits éthanoliques 60%, 80% et 100%. En outre, Al-Farsi et Lee (2008), ont rapporté l'acétone 50% d'acétone est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques à partir des noyaux de datte.

Les effets linéaire et quadratique du temps d'extraction sont aussi bien présentés dans la figure (16, a'', b'', c''). Les taux des polyphénols totaux augmentent rapidement avec l'augmentation de la durée d'extraction de 30 à 60 min pour les pépins, et de 60 à 90 dans le cas de la pellicule et de 30 à 45min pour la pulpe. Puis diminuent lentement de 65 à 90 min et de 50 à 60 min pour les pépins et la pulpe, respectivement et rapidement de 91 à 120 min pour la pellicule. En général, la valeur élevée en PT est obtenue à un temps d'extraction de 65, 90 et 49 min pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement. Mais, après ce temps optimal correspondant pour chaque matrice, la teneur en PT diminue.

Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature (Spigno *et al.*, 2007; Wissam *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Pileño *et al.* (2005b) ont montré que le taux d'extraction des composés phénoliques de raisin diminue avec l'augmentation du temps d'extraction. Ces résultats montrent que la structure de la matrice des trois parties étudiées libère le contenu de ses composés phénoliques rapidement, durant les premiers temps de contact avec le solvant d'extraction. Hismath *et al.* (2011) et Jerez *et al.* (2006) ont montré la même tendance au cours de l'extraction des composés phénoliques de feuilles de Margousier et de l'écorce de pin, respectivement.

Cette observation est expliquée par la deuxième loi de diffusion (loi de Fick) qui prédit un équilibre final entre les concentrations du soluté dans la matrice solide (matrice végétale) et dans le volume de solution (solvant) après un certain temps (Rodrigues *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2013). Cependant, l'augmentation dans la durée d'extraction peut causer la détérioration des substances bioactives par des facteurs défavorables tel que la lumière et l'oxygène (Naczki et Shahidi, 2004 ; Wissam *et al.*, 2012), ce qui explique probablement la deuxième partie des graphes obtenus dans la présente étude.

Les coefficients du facteur ratio échantillon/solvant des trois modèles générés, sont négatifs, ce qui implique que ce facteur a un impact négatif sur l'extraction des composés phénoliques à partir des trois échantillons étudiés (fig. 16 a',b',c'). Par conséquent, les taux phénoliques augmentent en diminuant ce rapport. En effet, lorsque ce paramètre diminue de 2,5 à 1 pour les pépins et de 5 à 2,5 pour la pellicule et de 1 à 0,4 pour la pulpe, une augmentation dans le rendement en PT est notée. Ces observations concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs (Pinelo *et al.*, 2005b; Jerez *et al.*, 2006 ; Mané *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008 ; Nagendra *et al.*, 2011). Chaalal *et al.* (2012), ont montré qu'une teneur élevée en composés phénoliques d'extraits des graines de la figue de barbarie est obtenue en diminuant le rapport échantillon/solvant, passant de 0,08 (0,8 g/10 ml) à 0,02 (0,2 g/10 ml). Une explication probable de ce phénomène est que l'utilisation d'un grand volume de solvant pourrait entraîner l'extraction d'une quantité plus grande en composés phénoliques, selon le principe du phénomène de la diffusion (Pinelo *et al.*, 2005b ; Ince *et al.*, 2014).

II.1.5. Détermination des conditions optimales

Les paramètres permettant une meilleure extraction des composés phénoliques à partir des trois matrices étudiées, sont obtenus à l'aide du module de Profileur de prévision (logiciel de JMP). Les conditions optimales d'extraction sont définies et rassemblées pour chaque matrice dans le tableau XV. Afin de confirmer les valeurs théoriques optimales, une validation expérimentale est réalisée en testant les paramètres optimaux sur deux extractions pour mesurer les teneurs en composés phénoliques. Les résultats expérimentaux ainsi obtenus sont de 96,56 mg/g MS, 39,57 mg/g MS et 100,89 mg/100g MF, qui sont très proches des valeurs prédites par les modèles générés indiquant ainsi la validité des modèles de surface de réponses réalisés pour l'extraction des composés phénoliques des trois fractions de la baie de raisin.

Tableau XV: Présentation des paramètres optimisés d'EMC

Variables	Réponses		
	Pépins	Pellicule	Pulpe
Concentration du solvant(%)	74,33	51,46	45,84
Temps d'extraction (min)	65,23	89,80	48,51
Ratio échantillon/solvant (g/ml)	0,1 /70,86	0,1 /32,25	10 /21,27
Valeurs prédites (PT)	96,23	39,22	94,43

II.2. Extraction Assistée par Microondes (EAM)

II.2.1. Construction du plan expérimental

Une procédure expérimentale basée sur un plan composite centré (PCC), est effectuée pour optimiser l'extraction des composés phénoliques totaux, à partir des trois parties de la baie de raisin *Ahmar Bou-Amar*, par la méthode d'extraction assistée par microondes (EAM). Les valeurs expérimentales de PT des extraits obtenus dans différentes conditions d'extraction sont présentées dans le tableau XVI.

Les deux facteurs étudiés pour optimiser l'extraction par microondes sont : le temps d'extraction par microondes et la puissance des microondes. Les autres paramètres ont été fixés ; la concentration du solvant et le rapport échantillon/solvant ont été fixés selon les résultats optimums trouvés dans l'étude précédente (macération conventionnelle). Chaque facteur, contenant trois niveaux, a été choisi d'après une série d'expériences préliminaires. Le modèle présente au total 11 expériences.

Les résultats montrent des variations marginales entre les réponses pour le même matériel végétal. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de pépins varient de 44,86 à 72,92 mg/g MS ; pour celles de la pellicule de 45,12 à 55,82 mg/g MS et concernant les valeurs retrouvés pour la pulpe vont de 70,33 à 130, 25mg/100g MF. Les équations (4), (5) et (6) montrent la relation entre les variables étudiées et les teneurs en composés phénoliques totaux des pépins (Y_1), de la pellicule (Y_2) et de la pulpe (Y_3).

Les modèles mathématiques postulés utilisés le plan composite centré pour deux facteurs sont des modèles de seconds degrés classiques, qui sont volontairement simplifiés par élimination des effets des termes jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (Goupy et Creighton, 2006).

$$Y_1 = 72,33 - 3,47X_1 - 4,98X_2 - 6,88X_1X_2 - 3,51X_1^2 - 9,22X_2^2 \quad (4)$$

$$Y_2 = 54,31 - 0,82X_1 - 0,72X_2 - 2,30X_1X_2 - 3,08X_1^2 - 3,12X_2^2 \quad (5)$$

$$Y_3 = 123,19 - 11,70X_2 - 14,41X_1X_2 - 22,64X_2^2 \quad (6)$$

Où: Y_1 , Y_2 et Y_3 : Concentration en PT des pépins (mg/g MS), Concentration en PT de la pellicule (mg/g MS) et Concentration en PT de la pulpe (mg/100g MF), respectivement.

Tableau XVI : Expériences réalisées dans le plan expérimental et réponses obtenues pour la technique d'EAM.

Expériences	Variables		Réponses		
	X ₁ -Temps (s)	X ₂ -Puissance d'irradiation (w)	Les Pépins PT (mg EAG /g MS)	La Pellicule PT (mg EAG /g MS)	La Pulpe PT (mg EAG 100/g MF)
1	0	0	71,83±0,79	54,92±0,84	129,94 ± 0,36
2	0	0	72,44±0,46	55,82±0,82	121,87 ± 0,14
3	-1	0	72,00±0,60	52,60±0,98	118,28 ± 0,09
4	-1	-1	60,68±0,95	47,76±0,34	106,65 ± 0,73
5	+1	-1	67,30±1,08	51,28±1,02	125,76 ± 0,21
6	0	+1	56,74±1,23	50,58±0,72	087,46 ± 0,14
7	-1	+1	65,74±0,73	51,51±0,64	108,73 ± 0,04
8	0	0	72,92±0,79	55,01±0,52	127,24 ± 0,41
9	0	-1	69,23±1,00	52,48±0,57	104,16 ± 0,24
10	+1	0	65,39±1,19	50,90±0,69	118,46 ± 0,76
11	+1	+1	44,86±1,90	45,12±0,61	070,16 ± 0,47

(-1), (0), (+1) : Niveaux des différentes variables ; X₁ : Temps d'extraction ; X₂ : Puissance d'irradiation ; PT : Polyphénols Totaux.

II.2.2. Validation des modèles

Les résultats de la variance et l'efficacité d'ajustement des modèles (la qualité des modèles) sont présentés dans le Tableau XVII.

L'analyse de la variance et de la régression montre que les modèles sont hautement significatives pour les trois matrices ($p < 0,001$) et qu'une forte proportion des variations des réponses mesurées (1%, 2% et 8% pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement) est expliquée par les trois modèles comme indiqué par les R^2 enregistrés des trois modèles ; $R^2 = 0,99$; $0,98$ et $0,92$ pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement (fig. 17). Ce qui implique, un degré de corrélation élevé entre les données observées et les valeurs prédites du modèle de régression. De plus, les valeurs des coefficients de détermination ajustés sont élevés ($R^2_{\text{ajustés}} = 0,98$; $0,97$ et $0,85$ pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement). Ceci démontre l'adéquation des trois modèles pour les résultats expérimentaux, qui est confirmé par le test du manque d'ajustement (*lack of fit*) où la valeur- $p > 0,05$ pour les trois modèles (Tableau XVII).

A partir de l'analyse de variances des modèles ainsi que leurs défauts d'ajustement, les trois modèles quadratiques étudiés ont de fortes puissances d'explication des résultats expérimentaux et sont jugés bons. Ainsi, nous pouvons conclure que les modèles étudiés peuvent être utilisés efficacement pour prédire les teneurs en PT des différents extraits avec la technique d'extraction assistée par microondes.

II.2.3. Effet des facteurs

Comme le montre le tableau XVII, les résultats d'analyse de variance indiquent que l'effet du temps d'extraction (X_1) et de la puissance microondes (X_2) sur l'extraction des PT à partir des différents extraits de pépins et de la pellicule est hautement significative ($p < 0,0001$) ainsi que leurs interactions et leurs effets quadratiques. Quant à la pulpe, l'effet linéaire du facteur temps n'a aucun effet significatif sur l'extraction de ces substances bioactives de même pour son effet quadratique (X_1^2), ce qui peut être attribué au choix effectué dans l'étude préliminaire. Cependant, son interaction avec le facteur puissance des microondes (X_1X_2) a un effet hautement significatif ($p < 0,009$).

Tableau XVII: Résumé de l'analyse de la variance (ANOVA) dans le cas d'EAM.

Source	Pépins				Pellicule				Pulpe			
	Ddl	Somme des carrés	Ratio- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>	Ddl	Somme des carrés	Ratio- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>	Ddl	Somme des carrés	Ratio- <i>F</i>	Valeur- <i>P</i>
Modèle	5	723,1177	129,2295	2,78383e-5	5	94,8697	69,9606	0,0001	5	3116,5631	12,8609	0,0070
X1 – Temps	1	207,6950	72,5813	0,0004	1	4,0520	14,9408	0,0118	1	61,9857	1,2790	0,3094
X2- P.I	1	480,6025	148,7268	8,61256e-5	1	3,1520	11,6220	0,0190	1	821,8791	16,9580	0,0092
X1X2	1	496,4884	189,1988	< 0,0001	1	21,1829	78,1057	0,0003	1	831,0844	17,1479	0,0090
X1 ²	1	85,2034	31,2173	0,0032	1	24,1343	88,9880	0,0002	1	0,0198	0,0004	0,9846
X2 ²	1	539,8073	215,4265	3,49442e-5	1	24,6201	90,7793	0,0002	1	1299,2175	26,8070	0,0035
Résidus	5	5,5956			5	1,3560			5	242,3279		
D.A	3	4,9984	5,5803	0,1557	3	0,9293	1,4520	0,4326	3	208,5468	4,1157	0,2016
Erreur pure	2	0,49984			2	0,4266			2	33,7811		
Erreur totale	10	728,7133			10	96,2257			10	3358,8910		
		R ² = 0,9923				R ² =0,9859				R ² =0,9278		

Ddl : Degrés de liberté ; P.I : Puissance d'Irradiation ; D.A : défaut d'ajustement.

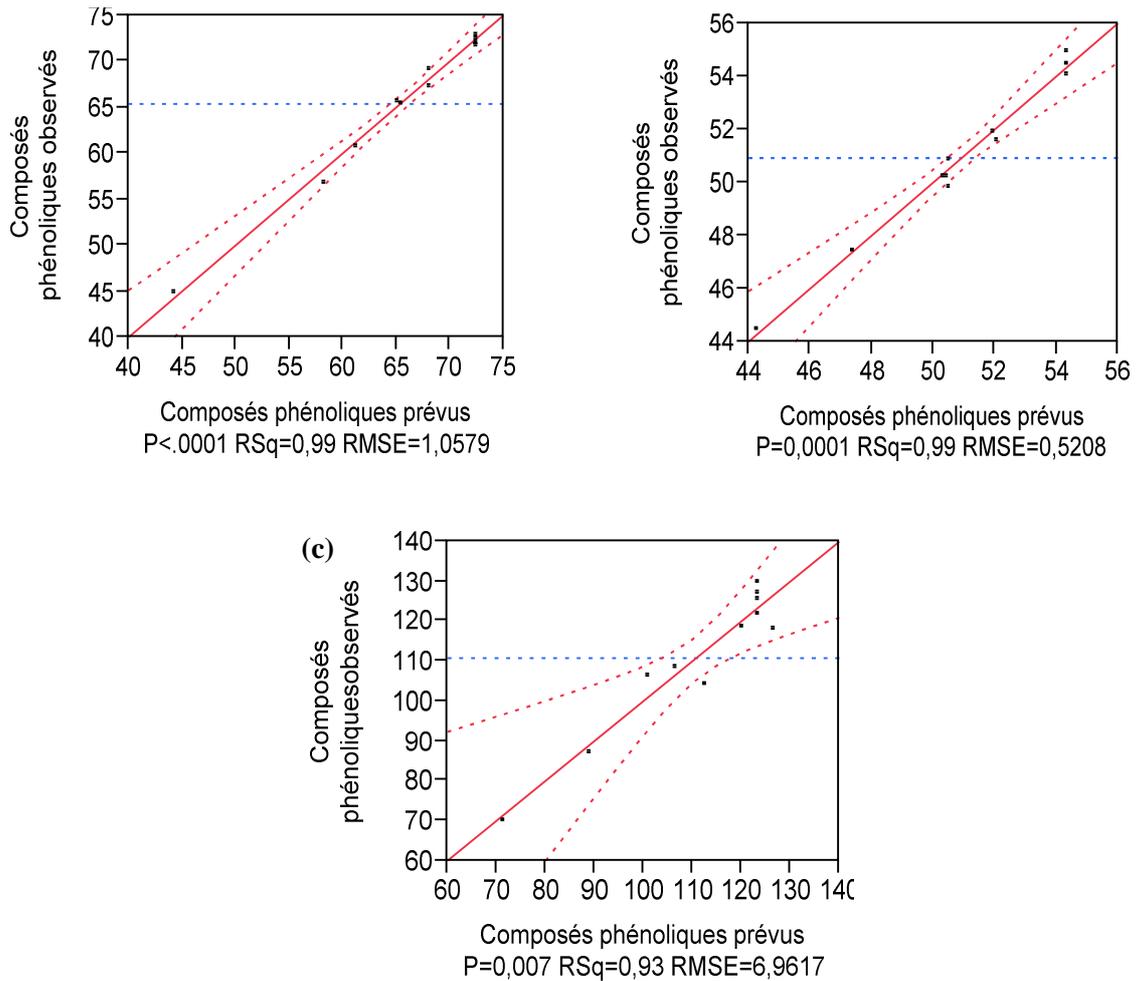


Figure 17 : Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour les composés phénoliques des extraits de pépins (a), de la pellicule (b) et de la pulpe (c), obtenus par EAM.

II.2.4. Représentation spatiale et analyse des modèles de surfaces de réponse

Selon les équations (4), (5) et (6) les coefficients négatifs pour X_1 et X_2 pour les pépins et la pellicule et le X_2 pour la pulpe, indiquent des effets linéaires de la puissance d'extraction et du temps d'extraction qui peuvent diminuer les réponses (PT).

La relation entre PT et variables dépendantes est présentée graphiquement en trois dimensions en surfaces de réponse (fig. 18).

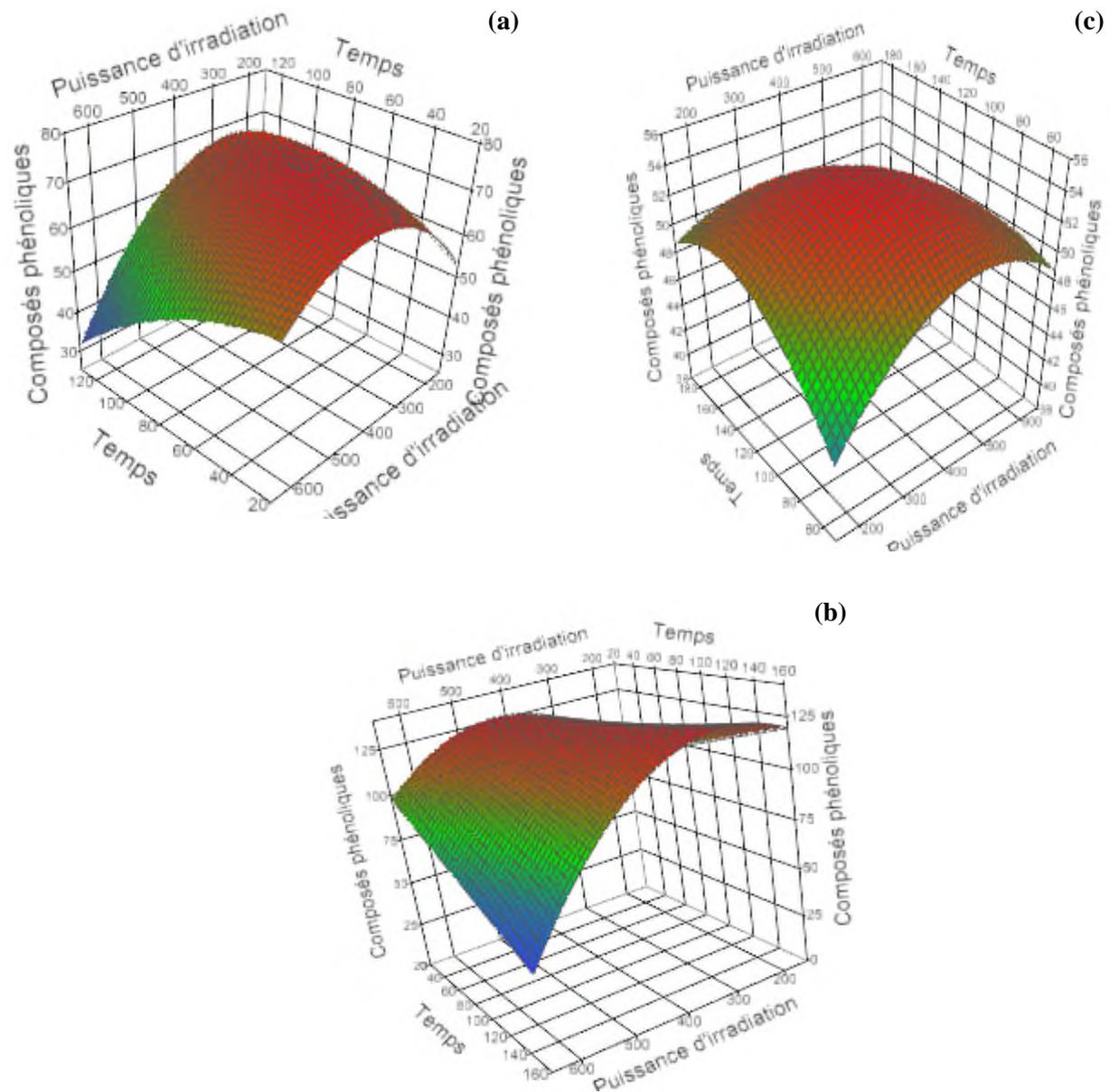


Figure 18: Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses des effets de la puissance d'irradiation et du temps d'extraction (a : pépins ; b : pellicule ; c : pulpe), sur l'extraction des composés phénoliques par EAM des différentes parties de la baie de raisin du cépage *Ahmar Bou-Amar*.

Ces illustrations indiquent que la teneur en PT augmente légèrement, à un temps d'irradiation constant, avec une augmentation de la puissance de microondes de 200 à 380, à 410 et à 310 W pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement, puis décroît rapidement à partir de 460, de 480 et de 420 à 600 pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement. Il a été observé aussi, dans le cas des pépins et de la pellicule, que

l'augmentation du temps d'irradiation à une puissance microondes plus faible, conduit à l'augmentation de la réponse. A une puissance microonde faible, l'impact du temps d'extraction a un effet positif sur le PT jusqu'à un temps d'extraction de 84 s et 146 s pour les pépins et la pellicule, respectivement. Après ce temps, son effet devient négatif c'est-à-dire elle diminue la réponse.

Il est très intéressant de noter que les PT (1) diminuent avec l'augmentation de la puissance des microondes pendant de plus longues durées d'extraction et (2) augmentent à faible puissance des microondes avec de longs temps d'extraction et à haute puissance avec une exposition de courte. Dans le cas de la pulpe, l'effet linéaire du temps d'extraction n'est pas significatif, par contre son interaction avec la puissance d'irradiation est significative, indiquant ainsi que l'extraction des polyphénols totaux à partir de cette matrice est influencée par l'interaction de ces deux paramètres. Il existe une forte interaction entre ces deux paramètres, qui bien montrée dans la figure (13) (cette interaction est hautement significative pour les trois modèles ; $p < 0,0001$; $p < 0,0003$ et $p < 0,0090$ pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement). Par ailleurs, la longue durée d'extraction associée à l'emploi des microondes de fortes puissances peut affecter la qualité des composés phénoliques. Cela pourrait résulter de la présence de substances bioactives thermolabiles dans les différentes fractions.

Afoakwah *et al.* (2012) ont rapporté que, le processus d'extraction d'EAM est largement influencé par la durée d'exposition à la chaleur. Ainsi, la quantité de composés actifs extraits peut être augmentée avec une augmentation du temps d'extraction, mais il existe un risque de détérioration des composés thermosensibles. Les résultats obtenus peuvent être expliqués par le fait que l'augmentation de la puissance microondes en courte durée d'extraction conduit à l'augmentation de la teneur en composés phénoliques, en augmentant la solubilité des substances actives, le taux de diffusion ainsi que le transfert de masse (Garcia-Salas *et al.*, 2010 ; Afoakwah *et al.*, 2012; Dahmoune *et al.*, 2013).

Cependant, il a été noté que l'augmentation de la puissance jusqu'à un certain niveau peut promouvoir la décomposition simultanée des composés phénoliques (Afoakwah *et al.*, 2012; Muthuselvi *et al.*, 2012).

II.2.5. Détermination des conditions optimales

Les conditions requises pour maximiser l'extraction des composés phénoliques par EAM à partir des différentes fractions de la baie de la variété *Ahmar Bou-Amar* sont déterminées et résumées dans le tableau XVIII.

La validité de valeurs optimales prédites (tableau XVIII) de PT pour chaque matrice, est confirmée expérimentalement : 73,15 et 54,84mg EAG/g MS et 135,27mg EAG/100g MF pour les pépins, la pellicule et la pulpe, respectivement. Les résultats expérimentaux obtenus sont très proches des valeurs théoriques indiquant ainsi la validité des modèles de surface de réponses réalisés pour l'extraction des composés phénoliques par EAM des trois fractions de la baie de raisin.

Tableau XVIII: Présentation des paramètres optimisés d'EAM.

Variables	Réponses		
	Pépins	Pellicule	Pulpe
Temps d'extraction (S)	58,63	113,74	83,05
Puissance microondes (W)	373,15	384,44	355,69
Valeurs prédites (PT)	73,29	54,38	124,68

Chapitre III
Dosage des
antioxydants

Chapitre III : Dosage des antioxydants

I. Composés phénoliques totaux

I.1. Composés phénoliques totaux des pépins

Les résultats présentés dans la figure 19 montrent que les teneurs en polyphénols totaux des pépins des différents échantillons étudiés varient d'un cépage à un autre selon la méthode d'extraction réalisée.

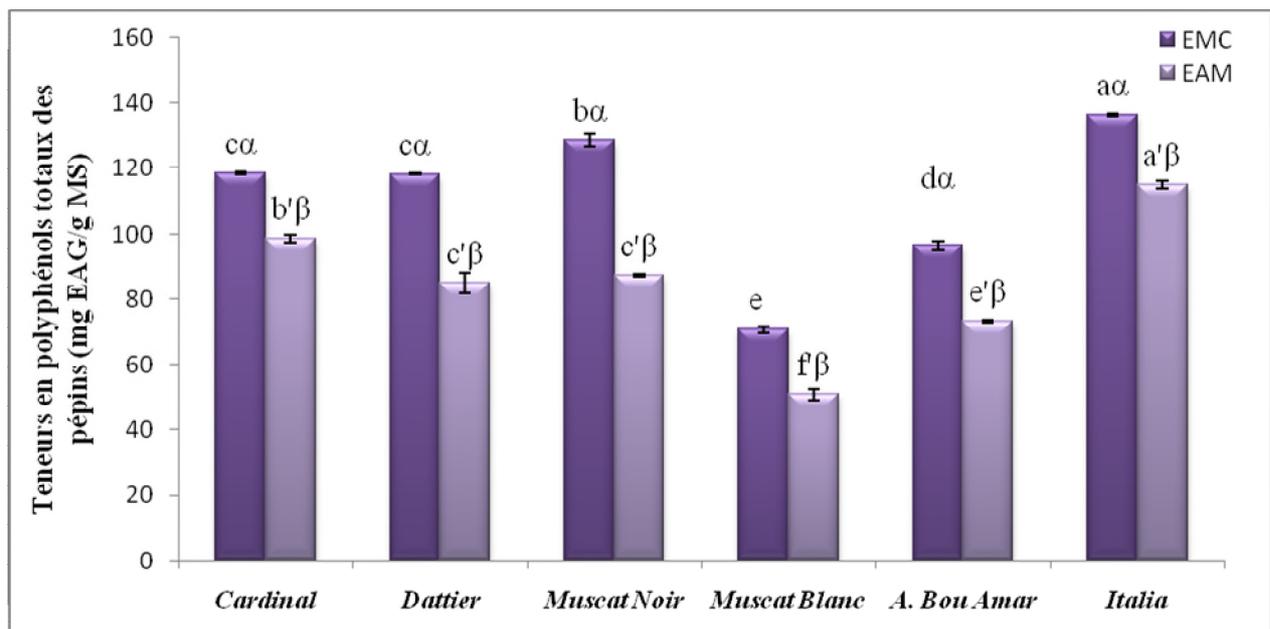


Figure 19: Teneurs en composés phénoliques totaux des pépins de raisins étudiés

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $a > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types

Des différences significatives entre les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits de pépins obtenus par EMC sont observées ($p < 0,05$) (fig.19), excepté les cépages *Cardinal* et *Dattier* qui montrent des teneurs similaires statistiquement. Même remarque a été observée concernant les extraits obtenus par EAM, en effet des différences significatives ont été révélées entre les différents extraits à part les cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* qui sont classés en troisième position. Les résultats obtenus montrent clairement, quelle que soit la technique d'extraction utilisée, que les pépins du cépage *Italia* sont les plus riches en composés

phénoliques avec une teneur de 136,43 et 114,86mg EAG/g MS obtenues par EMC et EAM, respectivement. Tandis que les pépins du cépage *Muscat Blanc* révèlent la teneur la plus faible (70,72 et 50,83 mg EAG/ g MS obtenues par EMC et EAM, respectivement).

Poudel *et al.* (2008), ont trouvé des teneurs en composés phénoliques qui varient entre 3,60 à 54,90 mg EAG/g de MS dans les pépins de cinq cépages de raisins Japonais. Dans une autre étude réalisée par Bucic-Kojić *et al.* (2007), en utilisant l'éthanol aqueux (50%) comme solvant d'extraction, ont noté des teneurs en polyphénols totaux variant entre 14,72 à 66,81 mg EAG/g MS. Casazza *et al.* (2010), ont obtenu dans l'extrait éthanolique des pépins de raisin Italien une teneur de 55,98 mg EAG/ g MS. Krishnaswamy *et al.* (2012), ont enregistré une valeur de 14,72 mg EAG/g MS dans un extrait éthanolique 30% des pépins de raisin. Lutterodt *et al.* (2011), ont trouvé des teneurs variant entre 5,93 à 89,60 mg EAG/g MS.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont plus élevés que ceux trouvés par les auteurs cités ci-dessus, excepté le cépage *Muscat Blanc* qui est dans l'intervalle de ces résultats. Cependant, ils sont plus faibles par rapport à ceux rapportés par Marqués *et al.* (2013) ; 300 mg/g MS dans les pépins de la variété *Syrah* et 668 mg/g MS dans les pépins de la variété *Narinle*. Aussi, plus faibles que ceux obtenus par Yemis *et al.* (2008), qui ont enregistré des teneurs allant de 339,45 et 587,30 mg EAG/g MS dans les pépins de 12 cépages de raisins cultivés en Turquie. Dans leur étude du profil phénolique et de l'activité antioxydante de 7 variétés de raisin Italien, Baiano et Terracone (2011), ont enregistré des teneurs en polyphénols totaux dans les pépins allant de 111 à 189 mg EAG/g MS ; dans le cépage *Italia* ils ont obtenu 183 mg EAG/g MS cette valeur est plus élevée que celle obtenue pour le même cépage étudié dans la présente étude (136,43 et 114,86 mg EAG/g MS).

Selon Orak (2007) et Du *et al.* (2012), plusieurs facteurs tels que la variété, les différences génétiques entre les différents cultivars ainsi que l'origine géographique, la composition du sol (Imre *et al.*, 2012) et la méthode d'extraction notamment le temps, la température et le solvant (Cacace et Mazza, 2003 ; Bucic-Kojić *et al.*, 2011 ; Thabit *et al.* 2014), pourraient influencer la teneur en composés phénoliques.

L'analyse statistique des résultats indiquent que quel que soit le cépage étudié, c'est la macération conventionnelle qui donne de meilleurs rendements en composés phénoliques totaux des pépins. Les teneurs en composés phénoliques totaux obtenues par EMC sont de 4,16% (pour

le cépage *Ahmar Bou-Amar*) à 33,95% (pour le cépage *Muscat Noir*) plus élevées que celles obtenues par EAM. Cela peut être dû à la sensibilité de leurs composés actifs à la chaleur.

Le traitement thermique provoque des changements irréversibles dans la structure des tanins Padmaja (1989). En effet, Padmaja (1989), a rapporté la diminution des teneurs en tanin dans les feuilles de manioc séchées à 60°C. Plusieurs études ont montré que l'extraction des tanins et les proanthocyanidines, qui sont les principaux composés phénoliques des pépins de raisin (Shi *et al.*, 2003 ; Cadot *et al.*, 2006 ; Bordiga *et al.*, 2011), diminuent avec l'augmentation de la température (Padmaja, 1989 ; Makkar et Becker, 1996 ; Spigno *et al.*, 2007). Liazid *et al.*, (2007) ont également montré que les micro-ondes peuvent facilement dégrader les composés phénoliques instables en raison de leurs propriétés structurelles. D'après ces auteurs, les composés phénoliques possédant un plus grand nombre de groupes hydroxyle dans leurs cycles aromatiques sont instables et sont facilement dégradés dans des conditions de température élevée.

Les rendements inférieurs en polyphénols totaux révélés dans les extraits obtenus par EAM, peuvent être dus aussi à une manifestation de la sélectivité du procédé, conduisant à une plus grande pureté des extraits. En effet, plusieurs études ont démontré que la EAM est une méthode d'extraction sélective (Ravalji *et al.*, 2012; Hithamani et Ramalakshmi, 2013; Wong-Paz *et al.*, 2014).

I.2. Composés phénoliques totaux des pellicules

Les résultats du dosage sont illustrés dans la figure 20. L'analyse statistique indique qu'il existe des différences significatives entre les teneurs en composés phénoliques des extraits de pellicules obtenus par EMC ($p < 0,05$), excepté les cépages *Cardinal* et *Dattier* qui présentent des teneurs statistiquement similaires ($p > 0,05$) et qui sont classés en deuxième position après *Le Muscat Noir*. L'analyse statistique a permis de les classer comme suite : *Muscat Noir* > *Dattier* = *Cardinal* \geq *Italia* = *Muscat Blanc* > *Ahmar Bou-Amar*.

Généralement le contenu phénolique des pellicules des raisins rouges est plus élevé que celui des raisins blancs. Cependant les résultats de la présente étude montrent la teneur en ces composés dépendent des cépages étudiés. En effet, la teneur en polyphénols totaux du *Cardinal* (cépage rouge) est statistiquement similaire à celle du *Dattier* (cépage blanc). Cette constatation

confirme les résultats obtenus par Baiano et Terracone (2011), qui ont étudié quatre cépages blancs et 3 cépages rouges.

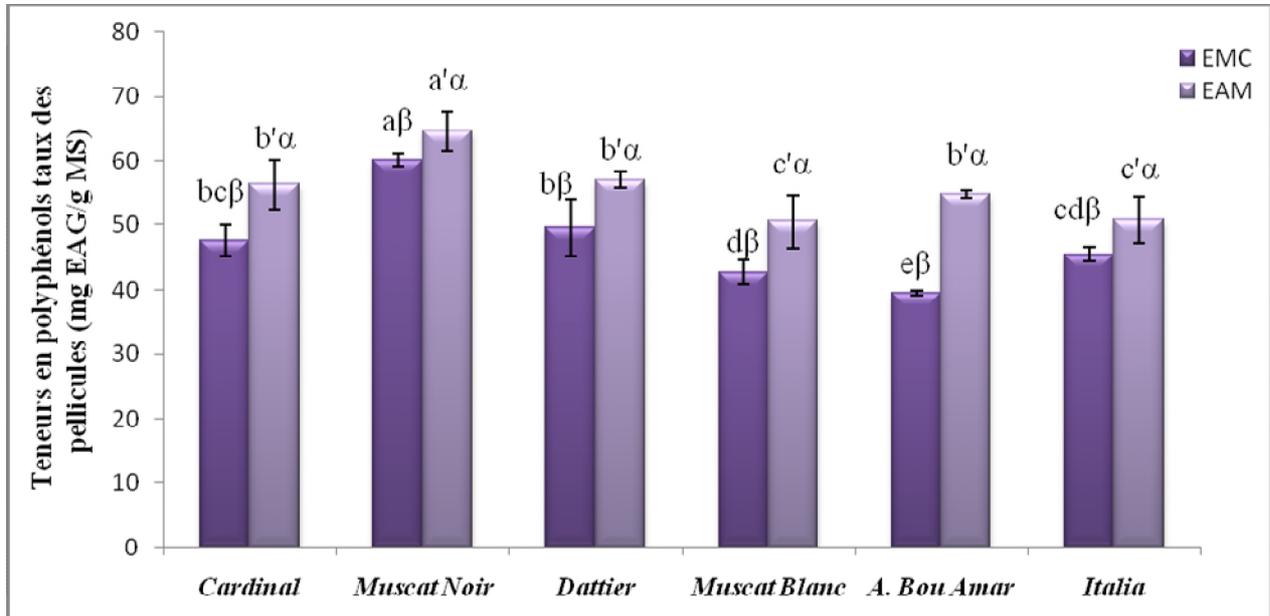


Figure 20: Teneurs en composés phénoliques totaux des pellicules de raisins étudiés

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types

Les teneurs en polyphénols totaux des pellicules des cépages étudiés varient de 39,57mg/g MS pour la variété *Ahmar Bou-Amar* à 64,64 mg/g MS pour le cépage *Muscat Noir* ; extraits obtenus par EMC et EAM, respectivement. Ces résultats sont relativement en accord avec ceux obtenus par Katalinic *et al.* (2010) (variant de 22,20 et 45,00 mg EAG/g de MS) et avec ceux retrouvés par Baiano et Terracone (2011) (variant de 22,7 et 62,9 mg EAG/G MS). Aussi, Baiano et Terracone (2011), ont obtenu une teneur en polyphénols totaux dans la pellicule du cépage *Italia* de 49,30 mg/g MS qui est proche des résultats obtenus dans la présente investigation pour la même variété (45,55 et 50,90 mg EAG/g MS obtenus par EMC et EAM, respectivement).

D'autre part nos résultats sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus par Casazza *et al.* (2010) (5,60mg EAG/ g MS), et par Caillet *et al.* (2006) (7,92 mg EAG/g de MS). Comme nous

l'avons précisé auparavant, ces différences peuvent être dues aux méthodes d'extraction. En effet, Wissam *et al.* (2012) et Thabit *et al.* (2014), ont démontré que la concentration en composés phénoliques dépend de la méthode et du solvant d'extraction. Ajouter à cela, l'effet variétal et les différences de milieux pédoclimatiques et de niveaux de maturité.

I.3. Composés phénoliques totaux des pulpes

Les résultats présentés dans la figure 21 montrent que les teneurs en polyphénols totaux des pulpes des différents échantillons étudiés varient d'une variété à une autre selon la méthode d'extraction réalisée.

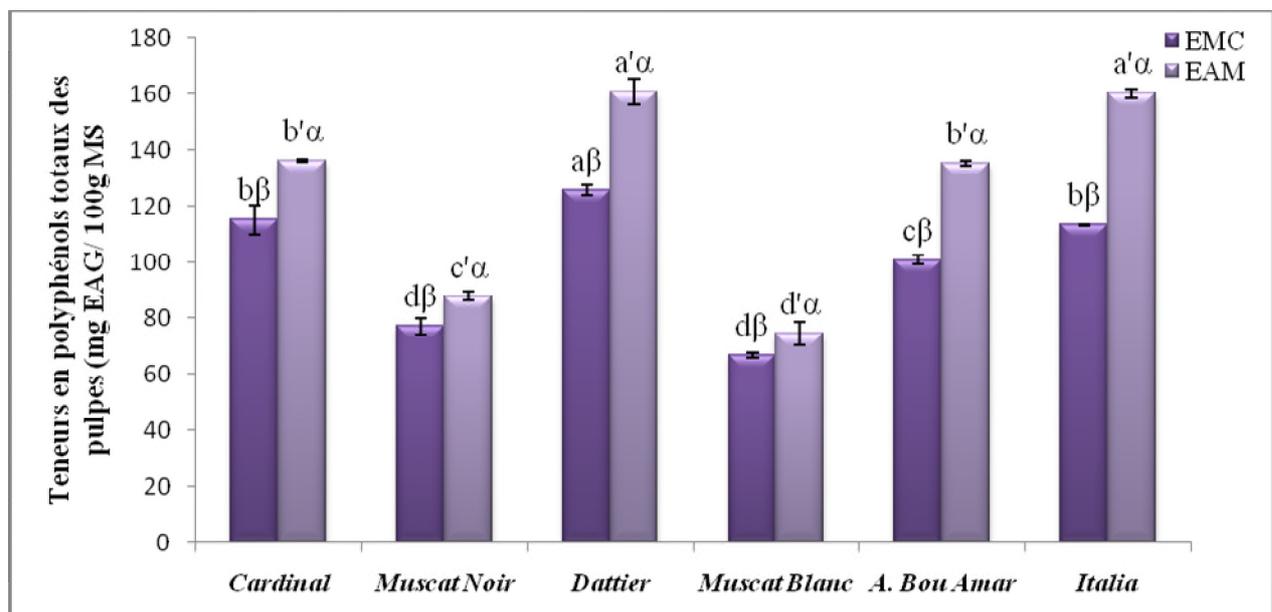


Figure 21: Teneurs en composés phénoliques totaux des pulpes de raisins étudiés

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Concernant les extraits obtenus par EMC, l'analyse statistique indique que c'est cépage *Dattier* qui contient la grande quantité de polyphénols totaux en comparaison avec d'autres cépages (125,86mg/100MF). En deuxième position viennent les cépages *Cardinal* et *Italia* avec des teneurs significativement similaires (115,20 et 113,28 mg/100MF, respectivement) ($p > 0,05$). La teneur la plus faible est détectée au niveau du cépage *Muscat Blanc* avec une teneur de 66,71mg/100g MF. Alors que les extraits obtenus par EAM, c'est les deux cépages *Italia* et

Dattier qui révèlent les teneurs les plus élevées significativement similaire (160,64 et 160,17 mg/100MF, respectivement) ($p < 0,05$), suivies du *Cardinal* avec une teneur de 136,19 mg/100MF. Le *Muscat Blanc* renferme la teneur la plus faible (74,46 mg/100MF).

Les teneurs en polyphénols totaux des pulpes des différents cépages sont en accord avec celles de 14 cépages rouges et blancs trouvées par Katalinic *et al.* (2010) qui s'étendent de 43,5 à 348,6 mg EAG/100g MF et avec celles obtenues par Hogan *et al.* (2009) qui, dans leur étude sur deux cépages rouges, ont noté des teneurs en composés phénoliques variant entre 63 mg/100g et 182 mg/100g MF. Elles sont également conformes avec les résultats obtenus par Marinova *et al.* (2005) qui ont trouvé des teneurs respectives de 184,1 et 213,3 mg/100g MF de raisin blanc et rouge (*Vitis Vinifera*).

Dans une étude effectuée par Cantos *et al.* (2002) sur sept variétés de raisins de table rouges, les auteurs ont obtenu des teneurs entre 13 mg/100g à 36 mg/100g MF. Ces résultats sont largement inférieurs de ceux trouvés dans la présente étude. Au contraire, les résultats obtenus par Ruberto *et al.* (2007), qui ont travaillé sur la pulpe de raisins rouges, qui varient entre 691 mg/100g et 1236mg/100g MF, et sont ainsi nettement plus élevés que les résultats du présent travail.

Les écarts trouvés entre les résultats obtenus et les données des différents auteurs déjà cités sont tout à fait justifiés. Comme nous l'avons précisé auparavant, les différences peuvent être expliquées par, les conditions d'extraction en terme de température et le nombre d'étapes d'extraction (Scalbert, 1991 ; Escribano-Baillón et Santos-Buelga 2001 ; Suhaj *et al.*, 2006 ; Tawaha *et al.*, 2007) ainsi que l'état et l'origine de l'échantillon en terme de provenance géographique, saison de collecte (raisins précoces, de saison ou tardifs) et cultivar ne peuvent pas être exclus (Ranalli *et al.*, 2006 ; Falleh *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009). Les composés phénoliques de raisin peuvent être sensiblement affectés par des conditions reliés à la région géographique du cultivar tel que le sol, composition, irrigation, intensité de la lumière (Cantos *et al.*, 2002).

Contrairement aux pépins, l'utilisation de la technique d'EAM révèle des rendements plus élevés en polyphénols totaux dans les pellicules et les pulpes quel que soit le cépage en question. L'efficacité de l'extraction, en termes de rendement et de la durée d'extraction, s'avère meilleure pour EAM que pour EMC avec une réduction dans le temps d'extraction jusqu'à 98%. En effet,

la technique EAM a permis d'extraire des taux en composés phénoliques jusqu'à 28% et 30% plus élevés que la méthode conventionnelle pour les pellicules et les pulpes, respectivement. Deux facteurs peuvent expliquer ces résultats : le temps réduit et la chaleur élevée dans le cas du procédé d'EAM.

En effet, il a été montré que l'augmentation du temps d'extraction prolonge l'exposition à l'oxygène et à la lumière (Wissam *et al.*, 2012), il y aura ainsi la possibilité d'oxydation des composés phénoliques (Naczki et Shahidi, 2004 ; Chew *et al.*, 2011). En plus, les cellules végétales renferment des enzymes susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases via des réactions de brunissements enzymatiques (Tomás-Barberán et Espin, 2001 ; Matuschek et Svanberg, 2004 ; Umi et Unal, 2005), une longue durée d'extraction peut favoriser ces réactions (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Les mêmes observations sont obtenues dans les études menées par Hithamani et Ramalakshmi, (2013) et Rafiee *et al.* (2011), qui ont montré que l'EAM est plus efficace que les procédés conventionnels accompagnés d'une réduction dans le temps d'extraction. La réduction de la durée d'extraction est due au mécanisme de chauffage des microondes (Jain *et al.*, 2009 ; Rafiee *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2013). Une haute température a un impact positif sur l'extraction des composés phénoliques. En effet, la température (1) permet de réduire la viscosité du solvant, ce qui lui permettrait par conséquent une meilleure pénétration dans les particules de la matrice et donc l'amélioration de l'extraction. D'autre part, (2) elle permet d'augmenter la solubilité des composés actifs à extraire, les coefficients de diffusion ainsi que la perméabilité des parois cellulaires (Afoakwa *et al.*, 2012 ; Muthuselvi *et al.*, 2012; Wissam *et al.*, 2012); En conséquence, l'EAM extrait mieux les polyphénols en comparaison à une extraction conventionnelle (Bayramoglu *et al.*, 2008).

Selon Ju et Howard (2003), la teneur la plus élevée en composés phénoliques d'extrait de la pellicule de raisin a été obtenue à 80-100 °C. En outre, l'étude réalisée par Fan *et al.* (2008) ont révélé que 80°C est la meilleure température d'extraction des composés phénoliques de la pomme de terre. Les mêmes constatations sont rapportées par Li *et al.* (2006) et Chaalal *et al.* (2012); les températures élevées améliorent l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes et des grains de la figue de barbarie, respectivement.

II. Anthocyanes

II.1. Sélection du solvant approprié

Les anthocyanes sont des pigments qui colorent les pellicules des variétés de raisins rouges et noires et sont absents chez les cépages blancs (Katalinic *et al.*, 2010 ; Bordiga *et al.*, 2011). L'extraction des anthocyanes nécessite un milieu acidifié et aussi un solvant approprié. Par conséquent, il est nécessaire de les extraire efficacement. Pour ce fait, trois solvants ont été choisis (méthanol 50% acidifié, éthanol 50% acidifié et l'acétone 50% acidifié).

La figure 22 présente les teneurs en anthocyanes des trois cépages rouges. L'étude statistique montre que la teneur en anthocyanes des extraits des pellicules des raisins rouges étudiés est significativement affectée par le type du solvant utilisé ($p < 0,05$). Les résultats obtenus révèlent que, quelle que soit la variété étudiée, l'éthanol est le solvant qui donne les teneurs les plus élevées en comparaison avec le méthanol et l'acétone. L'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des anthocyanes à partir de la pellicule des raisins présente l'ordre décroissant suivant : l'éthanol 50% > le méthanol 50% > l'acétone > 50% > l'eau.

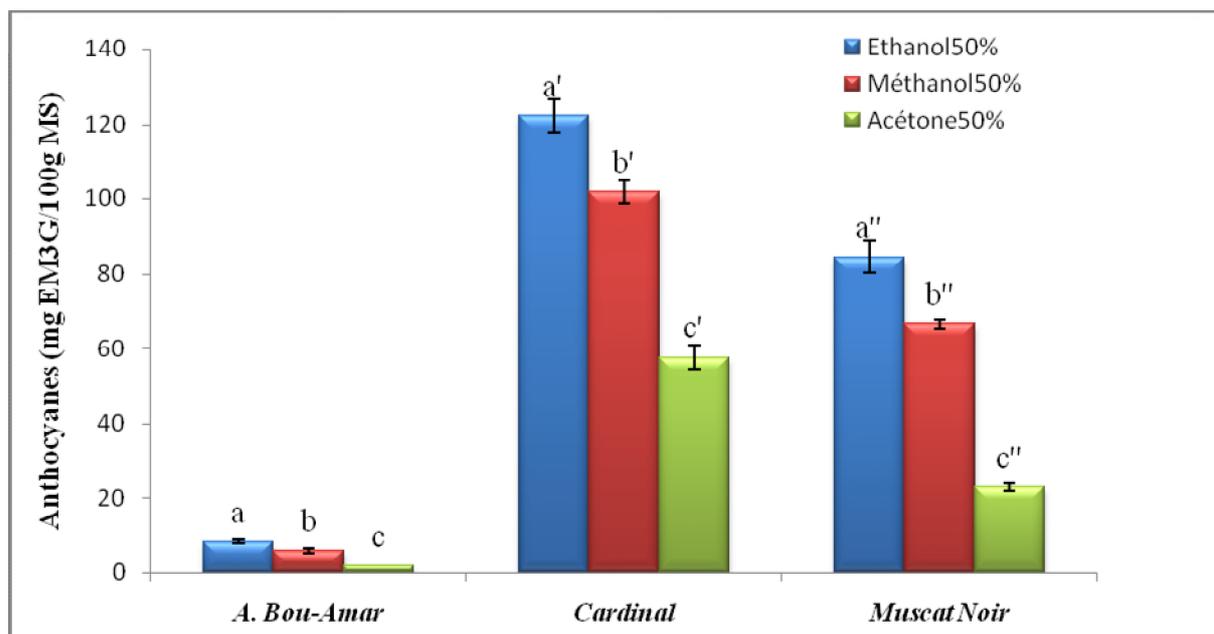


Figure 22: Effet du type du solvant sur l'extraction des anthocyanes de la pellicule des raisins rouge étudiés.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$) pour le même cépage. Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c$; $a' > b' > c'$; $a'' > b'' > c''$, pour Ahmar Bou Amar, Cardinal et Muscat Noir, respectivement. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Par conséquent, l'éthanol a été choisi comme le meilleur solvant d'extraction des anthocyanes à partir de la pellicule de raisin.

II.2. La concentration du solvant

La teneur en anthocyanes, en fonction des différentes concentrations du solvant sélectionné dans l'étape précédente est illustrée dans la figure 23. L'étude statistique montre que la concentration du solvant a un effet significatif sur la teneur en anthocyanes des extraits ($p < 0.05$). La teneur la plus élevée est obtenue avec l'éthanol 75 %, suivi par l'éthanol 50 %, 100 % et 25 %, quel que soit le cépage en question.

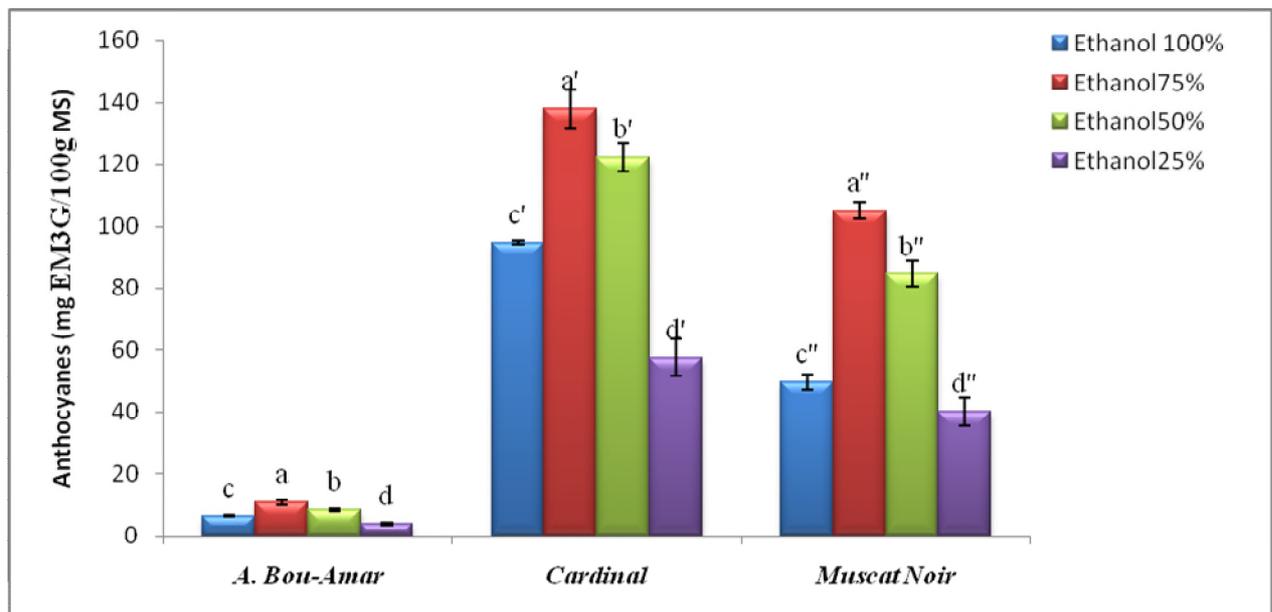


Figure 23: Effet de la concentration du solvant sur l'extraction des anthocyanes des pellicules de raisins rouge étudiés.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$) pour le même cépage. Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c$; $a' > b' > c'$; $a'' > b'' > c''$, pour *Ahmar Bou Amar*, *Cardinal* et *Muscat Noir*, respectivement. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Selon les résultats de la présente étude la teneur en anthocyanes, quel que soit le cépage, augmente avec la proportion d'éthanol dans le mélange du solvant d'extraction utilisé. Cependant, la teneur obtenue avec l'éthanol pur est faible par rapport à celle du solvant dilué (50% et 75%). De ce fait, l'éthanol 75% acidifié a été choisi pour être le meilleur solvant d'extraction des anthocyanes à partir des pellicules des raisins étudiés.

Les résultats montrent que la teneur en anthocyanes augmente avec la polarité du solvant utilisé, confirmant ainsi les résultats obtenus par Lapornik *et al.* (2005) et Liyana-Pathirana et Shahidi (2005). Selon ces auteurs, l'utilisation de l'eau en combinaison avec des solvants organiques contribue à la création d'un milieu modérément polaire qui assure l'extraction des composés phénoliques, toutefois, l'addition importante en eau mène à un extrait ayant une teneur élevée en impuretés (acides organiques, glucides, protéines solubles) qui peuvent interférer dans le dosage des composés phénoliques (Chirinos *et al.*, 2007).

L'analyse statistique indique que le *Cardinal* est le cépage le plus riche en anthocyanes avec une teneur de 137,83 mg EM3G/100g MS, suivi par le *Muscat Noir* avec une teneur de 104,93 mg EM3G/100g MS, quant à *Ahmar Bou-Amar* révèle une teneur (10,81 mg EM3G/100g MS) plus de douze fois moins faible que le *Cardinal* et dix fois moins faible que le *Muscat Noir*. Bordiga *et al.* (2011), ont obtenu des teneurs en anthocyanes de 206 et 104 mg EM3G/100g MS dans les pellicules des cépages Italiens *Cabernet Sauvignon* et *Nebbiolo*, respectivement. Les résultats obtenus dans la présente étude concordent avec ceux obtenus par les auteurs cités ci-dessus. Quant à Katalinic *et al.* (2010), en étudiant 14 cépages dont 7 sont des raisins blancs et 7 des raisins rouges, ont constaté que les raisins blancs ne contiennent pas ces molécules, au contraire, les raisins rouges présentent des teneurs oscillant entre 333 et 493 mg EM3G/100g MS pour variétés *Lasin* et *Rudezusa*, respectivement. Ces résultats sont plus élevés que ceux obtenus dans le présent travail. Butkhup *et al.* (2010) ont noté des teneurs en anthocyanes, dans les pellicules de raisins thaïlandais, allant de 5,06 à 55,45 mg/ 100g MS, ces teneurs sont inférieures aux résultats obtenus avec les deux variétés *Cardinal* et *Muscat Noir*, alors que la variété *Ahmar Bou-Amar* appartient à cet intervalle. Ces différences peuvent être expliquées par l'effet variétal. D'autres études ont montré que la teneur des anthocyanes dans les baies dépend des conditions de culture tel que la composition du sol, et l'intensité de la lumière, etc. (Mazza *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2004).

III. Caroténoïdes

Les teneurs en caroténoïdes des différentes parties des raisins étudiés sont représentées dans le tableau XIX.

Des différences non significatives ont été notées entre les teneurs en caroténoïdes des pulpes des cépages *Dattier* et *Cardinal* et entre celles des cépages *Italia* et *Ahmar Bou-Amar* ($p > 0,05$). L'analyse statistique permet de les classer selon leur contenu en caroténoïdes dans l'ordre

décroissant suivant : *Muscat Blanc* > *Dattier* = *Cardinal* > *Italia* = *Ahmar Bou-Amar* > *Muscat Noir*.

Les résultats obtenus montrent que la pulpe du cépage *Muscat Blanc* est la plus riche en caroténoïdes avec une teneur de 0,24 mg E β C /100g MF, suivie par *Dattier*, *Cardinal*. Tandis que le cépage *Muscat Noir* révèle la teneur la plus faible (0,1 mg E β C /100g MF). Mendes-Pinto (2009), a rapporté qu'une étude, réalisée par Razungles *et al.* (1987) sur 13 cépages français, a montré que la teneur en caroténoïdes varie entre 0,08 et 0,25 mg E β C/100g MF selon les cépages. Aussi, Crupi *et al.* (2010) ont étudié les caroténoïdes de quelques variétés de raisin de cuve et ont obtenu des teneurs allant de 0,072 à 0,205 mg/100g MF. Une autre étude sur 8 variétés de raisins de cuve de la région de Douro (Portugal) a rapporté des teneurs variant entre 0,039 à 0,195 mg/100g MF (Oliveira *et al.*, 2006). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans la présente étude.

Tableau XIX: Teneurs en caroténoïdes des différentes parties de la baie du raisin

Cépages	Pulpe (mg/100gMF)	Pellicule (mg/100gMS)	Pépins (mg/100gMS)
<i>A. Bou-Amar</i>	0,12 \pm 0,002 ^c	6,58 \pm 0,17 ^a	2,54 \pm 0,85 ^f
<i>Italia</i>	0,13 \pm 0,001 ^c	3,86 \pm 0,52 ^{bc}	3,18 \pm 0,15 ^e
<i>Muscat Noir</i>	0,10 \pm 0,001 ^d	4,24 \pm 0,15 ^b	9,84 \pm 1,06 ^a
<i>Muscat Blanc</i>	0,24 \pm 0,02 ^a	3,44 \pm 0,17 ^{cd}	4,52 \pm 0,32 ^d
<i>Dattier</i>	0,18 \pm 0,01 ^b	4,64 \pm 0,28 ^b	5,20 \pm 0,40 ^c
<i>Cardinal</i>	0,17 \pm 0,01 ^b	2,68 \pm 0,98 ^d	6,77 \pm 0,52 ^b

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$.

Concernant les pellicules, l'analyse statistique indique que le cépage *Ahmar Bou-Amar* est le cépage le plus riche en caroténoïdes avec une teneur de 6,58 mg E β C/100g MS suivie du *Dattier*, *Muscat Noir* et *Italia* (4,64 ; 4,24 et 3,86 mg E β C/100g MS, respectivement). La teneur la plus faible est enregistrée pour le *Cardinal* (2,68 mg E β C/100g de MS). Les données de la littérature sur la teneur en caroténoïdes des pellicules de raisins sont limitées. Dans leur étude sur la pellicule de 3 variétés de raisin (blanc, rouge et noir), Lancaster *et al.* (1997) ont rapporté des concentrations de 0,5 mg/100g MF pour les 3 variétés, ces résultats sont supérieures de ceux

trouvés dans le présent travail (qui varient entre 0,087 mg/100MF pour la variété *Italia* et 0,143 mg/100MF pour la variété *Ahmar Bou-Amar*). Bunea *et al.* (2012), ont trouvé, dans leurs travaux réalisés par une analyse avec HPLC sur la qualification et la quantification des caroténoïdes de la pellicule de raisin, des teneurs en β -carotène allant de 0,023 à 0,059 /100g MF et en lutéine allant de 0,047 à 0,086 mg/100g de MF.

Quant aux pépins, L'étude statistique révèle des différences significatives entre les teneurs en caroténoïdes des différentes variétés ($p < 0,05$). La variété *Muscat Noir* présente la teneur la plus élevée (9,84 mg E β C/ 100g MS), tandis que la variété *Ahmar Bou-Amar* révèle la teneur la plus faible (2,54 mg de E β C/ 100g MS). L'analyse statistique permet de les classer dans l'ordre décroissant suivant : *Muscat Noir* > *Cardinal* > *Dattier* > *Muscat Blanc* > *Italia* > *Ahmar Bou-Amar*. Il y a peu d'études relatives à la composition en caroténoïdes des pépins de raisins. Ce qui rend difficile de comparer nos résultats avec les données bibliographiques.

Les différences retrouvées entre les différentes variétés pour la même matrice, malgré que les conditions climatiques soient uniformes pour tous les cultivars (ils sont tous récoltés du même site géographique), peuvent être expliquées par l'effet de la variété. Selon Mendes-Pinto (2009), les profils qualitatif et quantitatif des caroténoïdes des raisins sont affectés par plusieurs facteurs comprenant la variété du raisin, états climatique et l'étape de maturation, ce qui explique aussi les différences retrouvées entre les résultats obtenus dans le cas des pellicules du présent travail et ceux rapportés dans la littérature.

IV. Vitamine C

Les résultats du dosage de la vitamine C des six cépages étudiés sont présentés dans la figure 24.

Les résultats obtenus montrent que le cépage *Italia* (15,12 mg EAA/100g MF) est le plus riche en vitamine C et que *Cardinal* présente (10,08 mg EAA/100g MF) la teneur la plus faible. L'analyse statistique révèle une différence significative entre les teneurs en vitamine C de toutes les variétés étudiées ($p < 0,05$).

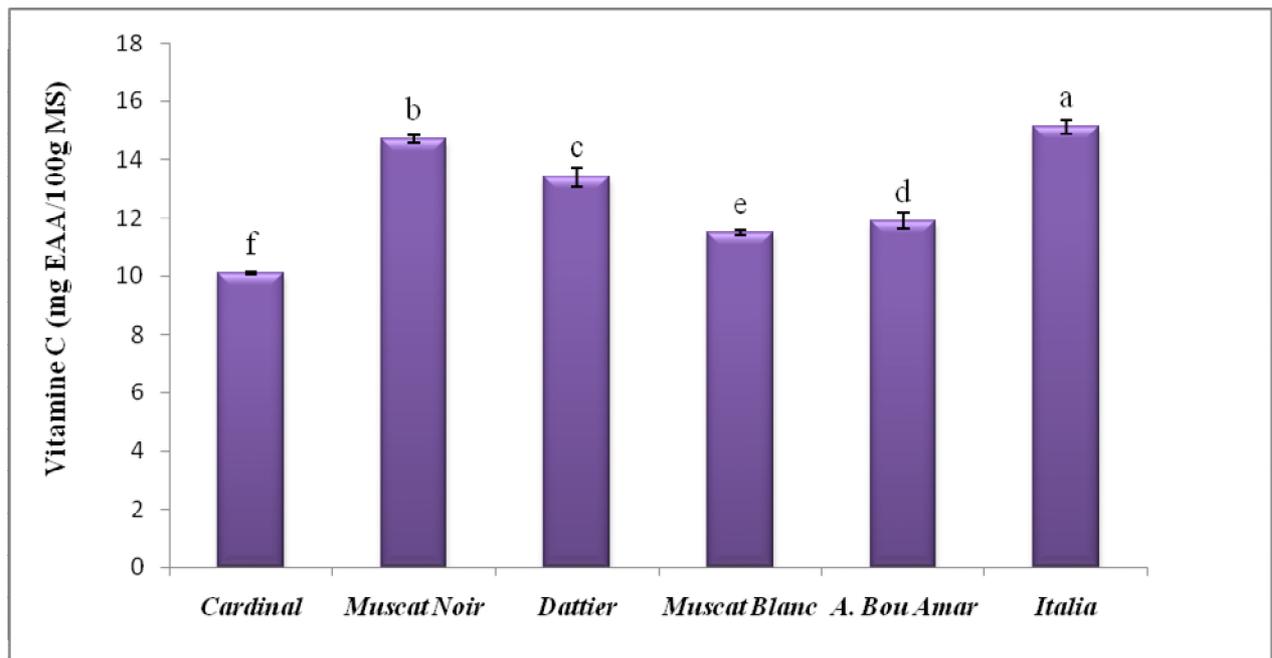


Figure 24: Teneurs en Vitamine C des différents jus de raisins étudiés.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Belitz *et al.* (2006) ont rapporté que la teneur moyenne en vitamine C dans le raisin est de 40mg/100g MF du fruit entier. Cependant celles obtenues dans les pulpes des variétés de raisin étudiées sont inférieures.

Dans leur étude sur 9 variétés de raisin de table cultivées en Turquie, Eydurán *et al.* (2015), ont obtenus des teneurs en vitamine C variant selon les cultivars de 11,21 (*Inek Emcegi*) à 35,74 mg/100g MF (*Hacabas*), passant par 15,73 mg/100g MF (*Yazen Dayi*). Les résultats trouvés dans la présente étude sont dans cet intervalle.

La variabilité des teneurs en acide ascorbique des raisins est affectée par plusieurs facteurs, Lee et Kader (2000) et Kader (2002) ont rapporté que les facteurs pré-récolte y compris les conditions climatiques notamment l'exposition au soleil, la maturité à la récolte, la méthode de récolte, les conditions de manipulation post-récolte (stockage), les espèces, les cultivars, les tissus, ainsi que le génotype (Sharique et Beigh, 2009) tous ces facteurs sont responsables de la grande variation de la teneur en vitamine C des fruits et légumes.

Chapitre IV
Profils phénoliques

Chapitre IV : Profils phénoliques

I. Acides phénols

I.1. Acides phénols de la pellicule

Les résultats de l'analyse par HPLC des acides phénoliques individuels identifiés dans les extraits, obtenus avec les deux méthodes d'extraction, des pellicules analysées sont récapitulés dans le tableau XX.

Les exemples de chromatogrammes sont montrés dans la figure 25, 2 pics sont détectés dans tous les chromatogrammes à des temps de rétention de 4,77 à 5,1 min et de 6,59 à 7,07 min. Cependant, les chromatogrammes enregistrés pour les cépages *Cardinal* et *Italia* montrent deux autres pics supplémentaires à des temps de rétention 19,86 à 20,44 et 20,83 à 21,37 min. Les composés sont identifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV-vis (320 nm) avec ceux des standards élus dans les mêmes conditions. Les composés élus en pics 1 et 2 sont des acides caftarique et coutarique, respectivement. Les composés en pic 3 et 4 n'ont pas été identifiés ni même quantifiés dans le cas de *Italia* pour leur teneur très faibles.

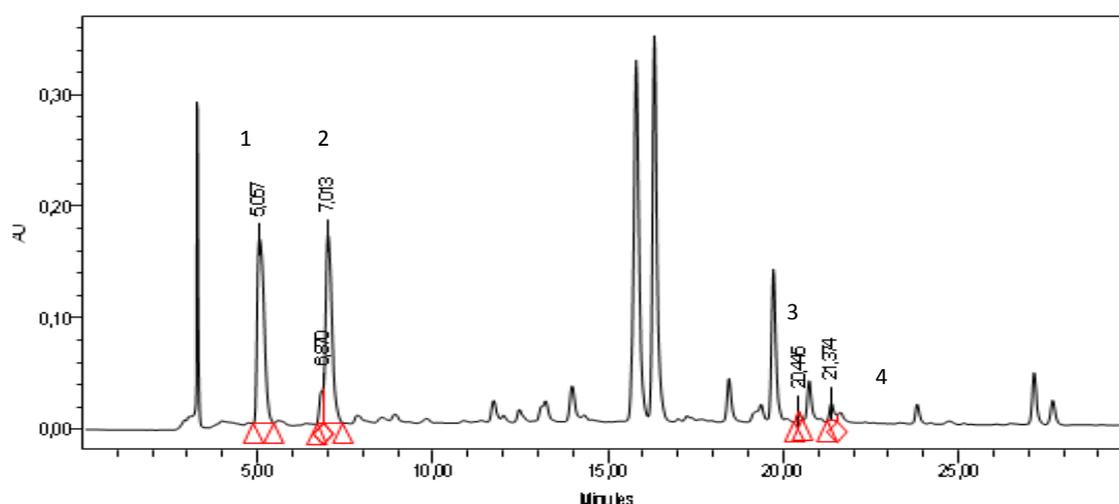


Figure 25 : Chromatogramme obtenu à 320 nm pour l'extrait de la pellicule du cépage *Cardinal*.

1 : acide caftarique. 2 : acide coutarique. 3 et 4 : Acides phénols non identifiés

Plusieurs auteurs ont détecté et identifié des acides phénoliques dans les pellicules de raisins. Rebello *et al.* (2013), ont obtenus 11 pics qui correspondent aux dérivés des acides caftarique et coutarique dans la pellicule de la variété *Violeta* cultivée à Brésil.

Tableau XX : Les acides phénols détectés dans les pellicules des raisins étudiés et leurs concentrations exprimées en mg EAC/Kg MS.

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	Ahmar Bou-Amar	Italia
EMC								
1	A. caftarique	4,77 à 5,1	389,15 ± 5,56 ^{ab}	283,67 ± 6,30 ^{aa}	192,69 ± 3,00 ^{b^β}	87,57 ± 2,24 ^{b^β}	428,74 ± 0,60 ^{ab}	208,42 ± 10,91 ^{ab}
2	A. coutarique	6,59 à 7,07	394,24 ± 0,01 ^{ab}	175,79 ± 1,13 ^{b^β}	352,80 ± 6,87 ^{ab}	131,29 ± 0,86 ^{ab}	232,25 ± 8,17 ^{b^β}	130,33 ± 5,89 ^{b^β}
3	A. phénol3	19,86 à 20,44	5,79 ± 0,28 ^{b^β}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nq
4	A. phénol4	20,83 à 21,37	12,59 ± 1,59 ^{b^β}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nq
MAE								
1	A. caftarique	4,77 à 5,1	405,26 ± 6,51 ^{ba}	290,23 ± 2,47 ^{aa}	217,82 ± 1,38 ^{ba}	88,89 ± 0,01 ^{b^α}	469,49 ± 0,21 ^{a^α}	241,71 ± 2,77 ^{a^α}
2	A. coutarique	6,59 à 7,07	420,04 ± 4,32 ^{a^α}	185,59 ± 1,70 ^{ba}	395,67 ± 0,13 ^{aa}	138,46 ± 2,46 ^{ca}	266,88 ± 0,21 ^{ba}	154,03 ± 0,28 ^{ba}
3	A. phénol3	19,86 à 20,44	9,39 ± 0,09 ^{ca}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nq
4	A. phénol4	20,83 à 21,37	24,5 ± 2,03 ^{ba}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nq

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant : $a > b > c > d$; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : temps de rétention. Nd : Non détecté. Nq : Non quantifié. EAC : Equivalent Acide Caféique. MS : Matière sèche.

De même, Perestrelo *et al.* (2012), ont détecté les acides caftarique et coutarique dans la pellicule du cépage *Sercial*, par contre, ils ont signalé la présence d'un troisième acide phénol « acide cinnamique » dans la pellicule du cépage *Tinta Negra*. L'étude réalisée par Barcia *et al.* (2014) a révélé la présence des dérivés de l'acide caftarique, coutarique et fertarique dans la pellicule du cépage *Violeta* cultivée à Brésil. Guerrero *et al.* (2009), ont identifié les acides *trans*-caftarique, *trans*-coutarique et *trans*-fertarique dans 5 cépages de raisins cultivés en Espagne. Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux rapportés par les auteurs cités ci-dessus.

L'analyse statistique indique que le composé le plus abondant est l'acide caftarique avec des teneurs 208,42 ; 283,67 et 428,74 mg/ Kg MS pour les cépages *Italia*, *Muscat Noir* et *Ahmar Bou-Amar*, respectivement. Ces résultats confirment ceux trouvés par Perestrelo *et al.* (2012) et Barcia *et al.* (2014), qui ont enregistré des taux plus élevés en acide caftarique en comparaison à d'autres acides phénols détectés dans les cépages *Sercial* et *Violeta*. La même constatation a été notée par Castello-Munoz *et al.* (2009), Jara-Palacios *et al.* (2014) et par Nile *et al.* (2013). Cependant, les cépages *Dattier* et *Muscat Blanc* renferment des teneurs plus élevés en acide coutarique, qui concordent avec les résultats obtenus par Perestrelo *et al.* (2012), dans le cas du cépage *Tinta Negra*, et par Rebello *et al.* (2013). Quant au *Cardinal* contient des teneurs statistiquement similaires en acide caftarique et coutarique.

Les concentrations totales en acides phénols enregistrées dans la présente étude varient de 218,87 à 865,64 mg/ Kg MS pour le *Muscat Blanc* et le *Cardinal*, respectivement (fig.26). Les cépages sont classés selon leur contenu en acides phénols, dans les pellicules, dans l'ordre décroissant suivant : *Cardinal*>*Ahmar Bou-Amar*> *Muscat Noir*>*Italia*> *Dattier*> *Muscat Blanc*.

L'analyse statistique indique que la teneur en acides phénols est affectée par l'effet variétal. Ceci confirme que la quantité des composés phénoliques dépend de la variété. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Perestrelo *et al.* (2012), qui varient de 221,7 pour le cépage *Tinta Negra* à 810,0 mg/Kg MS pour le cépage *Sercial*. Les résultats enregistrés par Barcia *et al.* (2014), varient de 563,6 à 872,0 mg/Kg MS dans la pellicule du cépage *Violeta* récolté en 2011 et en 2012, respectivement, ces résultats sont également proches des résultats de la présente étude. Cependant, les résultats de notre étude sont nettement plus importants de ceux trouvés par Jara-Palacios *et al.* (2014) qui ont enregistré 54,8 mg/Kg MS d'acide hydroxycinnamique dans la

pellicule de la variété *Zalema* cultivé en Espagne et par Guerrero *et al.* (2009), qui ont obtenu des teneurs allant de 1,5 à 3,1 mg/Kg MS. En outre, Mané *et al.* (2007), ont obtenu des teneurs de 1140 à 2100 mg/Kg MF (100,31 à 303,57 mg/Kg MF, pour le *Muscat Blanc* et *Cardinal*, respectivement), qui sont largement supérieures de celle retrouvées dans la présente étude.

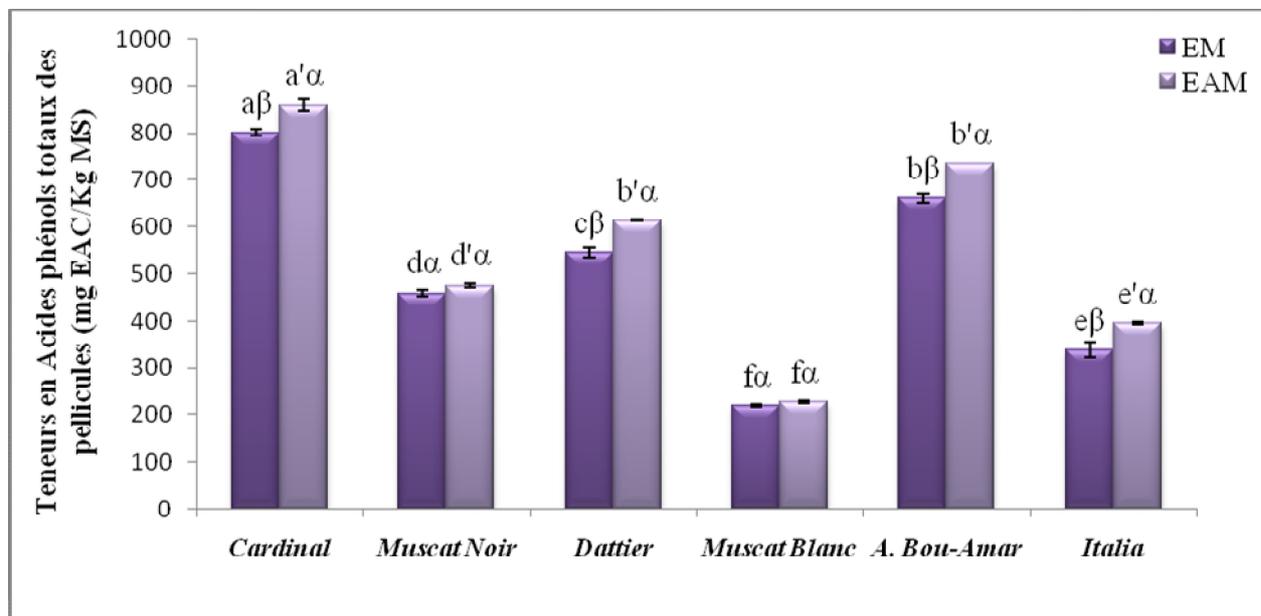


Figure 26 : Teneurs en acides phénols totaux des pellicules de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Ces différences peuvent être attribuées à l'effet variétal, ce qui est confirmé dans la présente étude, à l'origine géographique, aux conditions climatiques qui varient d'une année à une autre, à la technique d'extraction et au solvant d'extraction. L'étude menée par Barcia *et al.* (2014), a démontré que la teneur en acides phénols du même cépage varie d'une année à une autre.

La méthode d'extraction affecte significativement la teneur en acides phénols individuelle et totale de la pellicule des cépages étudiés ($p < 0,05$). L'extraction de l'acide coutarique est affectée positivement par la chaleur engendrée par les microondes, quel que soit le cépage ; cet acide est mieux extrait en appliquant les microondes comme moyen d'extraction avec des teneurs de 5 à 15% plus importants que la méthode conventionnelle. La même remarque a été observée pour les

deux acides phénoliques minoritaires détectés dans la pellicule du *Cardinal* (38% et 47%). Cependant, le rendement d'extraction en acide caftarique dépend du cépage, il est affecté positivement par les microondes dans le cas des cépages *Dattier*, *Ahmar Bou-Amar* et *Italia* alors qu'aucune différence significative n'a été révélée entre les deux méthodes pour les 3 autres variétés. D'une manière globale, la teneur totale en acides phénols est affectée positivement par la technique d'EAM pour la majorité des variétés, sauf pour les deux *Muscat* où aucune différence significative n'a été notée entre les deux méthodes d'extraction.

I.2. Acides phénols de la pulpe

La figure 27 montre les chromatogrammes représentatifs obtenus par l'analyse HPLC à 320nm des extraits de pulpes. 13 composés sont détectés au total dans les 6 cépages. Le cépage *Cardinal* renferme le plus grand nombre de pics ; 10 acides hydroxycinnamiques ont été détectés dans la pulpe de ce cépage. Cependant, que 6 pics ont été révélés dans les extraits du cépage *Muscat Noir*. Les résultats du dosage en acides hydroxycinnamiques individuels des extraits de la pulpe, obtenus par les deux méthodes d'extraction étudiées, sont présentés dans le tableau XXI. Les résultats montrent clairement que le profil quantitatif et qualitatif des dérivés d'acides hydroxycinnamiques dépend de la variété étudiée.

Les dérivés d'hydroxycinnamiques habituellement retrouvés dans la pulpe de raisin à savoir : acide *trans*-caftarique, acides *cis*- et *trans*-coutarique et acides *cis*- et *trans*-fertarique sont détectés et identifiés dans les extraits analysés (pic 4, 5, 6, 8 et 11). Cependant, d'autres composés ont été détectés mais sans pouvoir les identifier. Bien que les caractéristiques spectrales des composés élus en pic 1 et 2 paraissent similaires, et que nous puissions suspecter des isomères, la méthode ne permet pas d'affirmer qu'ils en soient. Le composé en pic 1 est seulement détecté dans le cépage *Ahmar Bou-Amar*, alors que le composé en pic 2 est révélé dans tous les cépages avec la proportion la plus élevée des acides phénols dans la pulpe de la majorité des variétés (40-60%), excepté les variétés *Muscat Noir* et *Italia* dont le composé prédominant étant l'acide fertarique (52% et 41%, respectivement). Cependant, l'extrait obtenu par microondes à partir de la variété *Italia*, l'acide caftarique est le plus abondant (59%), ce qui est probablement dû à la différence de l'effet de la méthode d'extraction sur la récupération des composés individuels. Le composé apparu en pic 3 n'est pas révélé dans les deux *Muscat* mais détectés dans tous les autres cépages. Les acides phénols élus en pics 9 et 12 sont suggérés des isomères pour leurs spectres qui sont très proches, mais restent non identifiés tout comme les composés en pics 7, 10.

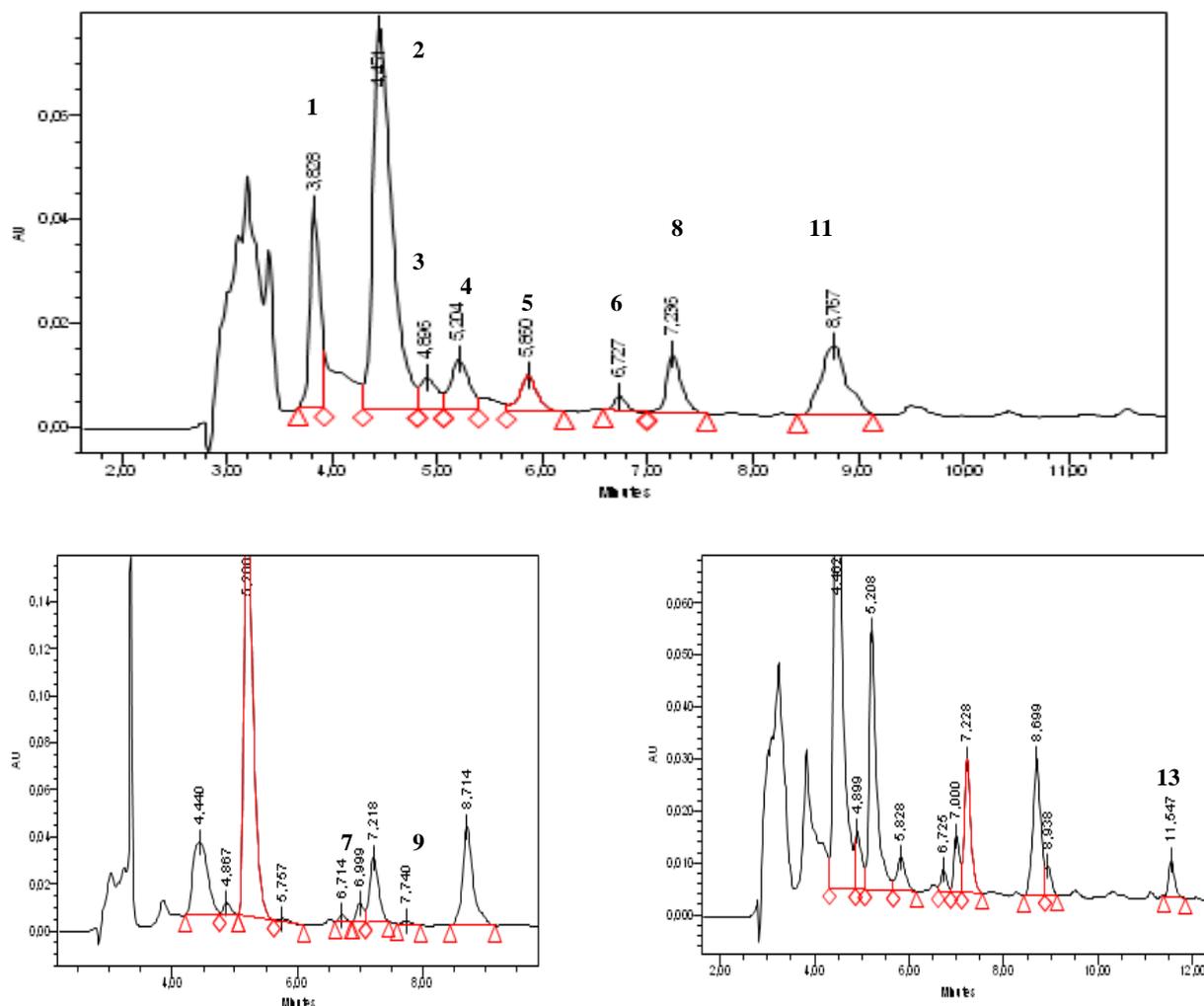


Figure 27: Chromatogrammes obtenus à 320 nm pour les extraits de pulpe des cépages *Ahmar Bou-Amar* (a), *Italia* (b) et *Dattier* (b).

Les chiffres de 1 à 13 correspondent aux composés identifiés comme acides phénols dans les extraits de pulpes.

Le profil des acides phénoliques de la pulpe de raisin a été rapporté par plusieurs auteurs ; Baiano et Terracone (2011), ont détecté l'acide gallique, l'acide 3,4-dihydroxyphenylacetate, l'acide protocatechualdehyde, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide caféique et l'acide syringique dans les variétés *Italia* et *Pizzutello*. Rebello *et al.* (2013), ont identifié 10 dérivés d'acides hydroxycinnamique dans la pulpe de la variété *Violeta* qui sont donnés ici selon leurs temps de rétention par ordre croissant comme suit : acide *trans*-caftarique, caffeoyl-glucose-1, caffeoyl-glucose-2, *cis*-coutarique, *trans*-coutarique, caffeoyl-glucose-3, p-coumaroyl-glucose-1, *cis*-fertarique, *trans*-fertarique et p-coumaroyl-glucose-3.

Tableau XXI: Les acides phénols individuels détectés dans les extraits de pulpes des raisins étudiés (mg EAC/Kg MF) obtenus par les deux méthodes d'extraction.

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	Ahmar Bou-Amar	Italia
EMC								
1	AP1 (NI)	3,82 à 3,87	Nd	Nd	Nd	Nd	1,63 ± 0,36 ^{eβ}	Nd
2	AP2(NI)	4,40 à 4,55	21,59 ± 0,82^{aβ}	8,80 ± 1,54 ^b	43,92 ± 3,69^{aa}	10,31 ± 0,72^{aβ}	27,89 ± 1,27^{aβ}	13,54 ± 3,52 ^{ca}
3	AP3(NI)	4,86 à 4,91	2,14 ± 0,21 ^{fgβ}	Nd	3,48 ± 0,15 ^{ea}	Nd	1,75 ± 0,34 ^{deβ}	2,90 ± 0,20 ^{dβ}
4	A. caftarique	5,11 à 5,20	7,26 ± 0,04 ^{dβ}	0,69 ± 0,04 ^d	10,02 ± 0,33 ^{cβ}	1,83 ± 0,30 ^{ca}	2,52 ± 0,09 ^{cdβ}	11,94 ± 1,60 ^{eβ}
5	A. coumarique	5,56 à 5,75	1,26 ± 0,13 ^{ghα}	Nd	Nd	0,25 ± 0,05 ^{eβ}	1,19 ± 0,09 ^{eβ}	0,95 ± 0,40 ^{ea}
6	A. <i>cis</i> -coutarique	6,57 à 6,72	2,58 ± 1,96 ^{fgα}	1,52 ± 0,11 ^d	0,52 ± 0,01 ^{fβ}	0,39 ± 0,04 ^{deα}	0,31 ± 0,01 ^{fβ}	4,60 ± 0,56 ^{da}
7	AP4(NI)	6,90 à 7,09	4,35 ± 0,64 ^{ea}	0,70 ± 0,16 ^d	7,71 ± 0,14 ^{da}	2,90 ± 0,08 ^{ca}	Nd	20,30 ± 0,87 ^{ba}
8	A. <i>trans</i> -coutarique	7,17 à 7,23	17,90 ± 2,03 ^{ba}	6,03 ± 0,99 ^c	4,72 ± 0,87 ^{eβ}	0,56 ± 0,31 ^{dβ}	2,66 ± 0,09 ^{eβ}	Nd
9	AP5(NI)	7,74 à 7,84	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,94 ± 0,07 ^{ea}
10	AP6(NI)	8,17 à 8,25	0,52 ± 0,11 ^{ha}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
11	A. fetarique	8,58 à 8,62	13,00 ± 0,62 ^{ca}	20,05 ± 4,09^{aa}	22,04 ± 1,42 ^{ba}	8,26 ± 0,31 ^{ba}	12,82 ± 1,02 ^{ba}	39,79 ± 5,46^{aa}
12	AP7(NI)	8,73 à 8,93	3,89 ± 0,07 ^{efα}	Nd	Nd	1,09 ± 0,37 ^{da}	Nd	Nd
13	AP8(NI)	11,44 à 11,55	Nd	Nd	1,19 ± 0,13 ^{fa}	Nd	Nd	Nd

Tableau : (suite)

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	Ahmar Bou-Amar	Italia
<u>EAM</u>								
1	AP1	3,82 à 3,87	Nd	Na	Nd	Nd	8,99 ± 0, 84 ^{ba}	Nd
2	AP2	4,40 à 4,55	39,22 ± 0,44^{aa}	Na	48,44 ± 1,88^{aa}	18,54 ± 0,72^{aa}	32,33 ± 1,14^{aa}	19,23 ± 0,68 ^{ba}
3	AP3	4,86 à 4,91	2,90 ± 0,30 ^{efa}	Na	3,41 ± 0,11 ^{ca}	Nd	2,65 ± 0, 05 ^{fa}	1,67 ± 0,09 ^{dea}
4	A. caftarique	5,11 à 5,20	12,80 ± 0,03 ^{ca}		19,27 ± 0,67 ^{ba}	1,43 ± 0,05 ^{dea}	4,18 ± 0,14 ^{ea}	69,30 ± 3,76^{aa}
5	A. coumarique	5,56 à 5,75	1,38 ± 0,16 ^{ga}	Na	2,97 ± 0,06^{ea*}	0,85 ± 0,01 ^{fga}	2,98 ± 0,14 ^{fa}	0,55 ± 0,05 ^{ea}
6	A. cis-coutarique	6,57 à 6,72	4,03 ± 0,10 ^{dea}		1,38 ± 0,02 ^{fa}	0,24 ± 0,01 ^{gβ}	0,75 ± 0,05 ^{ga}	3,35 ± 0,32 ^{dβ}
7	AP4(NI)	6,90 à 7,09	5,31 ± 0,77 ^{da}		3,25 ± 0,14 ^{eβ}	0,41 ± 0,07 ^{gβ}	Nd	11,01 ± 1,01 ^{eβ}
8	A.trans-coutarique	7,17 à 7,23	17,42 ± 1,47 ^{ba}		8,35 ± 0,51 ^{da}	3,13 ± 0,12 ^{ca}	5,47 ± 1,31 ^{da}	Nd
9	AP5(NI)	7,74 à 7,84	Nd	Na	Nd	Nd	Nd	0,54 ± 0,001 ^{eβ}
10	AP6(NI)	8,17 à 8,25	0,42 ± 0,07 ^{ga}	Na	Nd	Nd	Nd	Nd
11	A. fertarique	8,58 à 8,62	11,89 ± 0,72 ^{ca}		10,96 ± 0,05 ^{eβ}	6,14 ± 0,64 ^{bβ}	7,30 ± 1,05 ^{eβ}	20,60 ± 2,19 ^{bβ}
12	AP7(NI)	8,73 à 8,93	2,44 ± 0,04 ^{efβ}	Na	1,48 ± 0,21^{fa*}	0,99 ± 0,07 ^{efa}	Nd	Nd
13	AP8(NI)	11,44 à 11,55	Nd	Na	0,20 ± 0,01 ^{gβ}	Nd	Nd	Nd

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : Temps de Rétention ; Nd : Non détecté. Nq : Non quantifié. Na : Non analysé.

Nile et al. (2013), ont détecté que 3 acides phénols dans la pulpe de 20 variétés y compris le cépage *Italia* qui est étudié dans le présent travail; les acides hydroxycinnamique ainsi identifiés par ces auteurs sont : l'acide caféique, l'acide coumarique et l'acide cinnamique. 3 acides hydroxycinnamique ont été identifiés dans la pulpe du cépage *Cynthiana* (acide caftarique, coutarique et fertarique) par Ramirez-Lopez *et al.* (2014).

Le profil des acides hydroxycinnamique publié sur la pulpe du cépage *Garnacha Tintorera* par Castillo-Munoz *et al.* (2009), est comme suit : l'acide *trans*-caftarique (le plus abondant), *trans*-coutarique, *cis*-coutarique et *trans*-fertarique. Deux acides hydroxycinnamique ont été rapportés dans l'étude de Topalović et Mikulić-Petkosek (2010), dans la pulpe du cépage *Cardinal* : l'acide syringique et l'acide chlorogénique.

Dans l'étude d'Eyduran *et al.* (2015), dans la pulpe de 9 variétés de raisin de table : Acide Chlorogénique et Acide Ferulique. Des tentatives d'identification ont été effectuées en se référant aux données bibliographiques mais il est difficile de faire des comparaisons et en tirer des conclusions sur l'identification des composés détectés non identifiés dans le présent travail ainsi une méthode plus précise est recommandée dans notre cas.

Les teneurs en acides phénols totaux obtenues avec les deux méthodes d'extraction étudiées sont présentées dans la figure 27. Les concentrations notées oscillent de 25,21 (*Muscat Blanc*) à 94,95 mg/Kg MF (*Italia*) ; résultats enregistrés dans les extraits obtenus par macération conventionnelle. Dans le cas des extraits obtenus par EAM ces teneurs varient de 31,74 (*Muscat Blanc*) à 126,27 mg/Kg MF (*Italia*). L'analyse statistique indique que la pulpe de la variété *Italia* est la plus riche en acide phénols et les variétés sont classées selon leur teneur en acide phénols comme suite : *Italia* ≥ *Dattier* ≥ *Cardinal* > *Ahmar Bou-Amar* > *Muscat Noir* > *Muscat Blanc*.

Ces résultats sont en agrément avec ceux obtenus par Rolle *et al.* (2015), dans leur étude de l'effet de la taille des baies sur le contenu phénolique du cépage *Muscat Hamburg* (94,8-111,8 mg/Kg MF). Cependant, ils sont inférieurs de ceux trouvés par Mané *et al.* (2007) ; 170, 210 et 340 mg/Kg MF dans la pulpe des variétés *Pinot Meunier*, *Pinot Noir* et *Chardonnay*, respectivement. Dans une étude réalisée par Nile *et al.* (2013), portée sur la caractérisation du profil phénolique de 20 variétés de raisin cultivées en Corée, ont enregistré des teneurs en acide phénols allant de 106,1 à 1304,8 mg/kg MF dans la pulpe des cépages *Delaware* et *Fluoxa*, respectivement, ces résultats obtenus sont supérieurs de ceux trouvés dans la présente étude.

Cependant ces derniers sont supérieurs de 3,41 mg/Kg MF résultat enregistré par Topalović et Mikulić-Petkosek (2010), dans le cépage *Cardinal*. Ces différences peuvent être attribuées à l'effet de variété, ou aux facteurs climatiques (lumière, altitude) liés à la zone géographique (localité) et aussi à la méthode d'extraction.

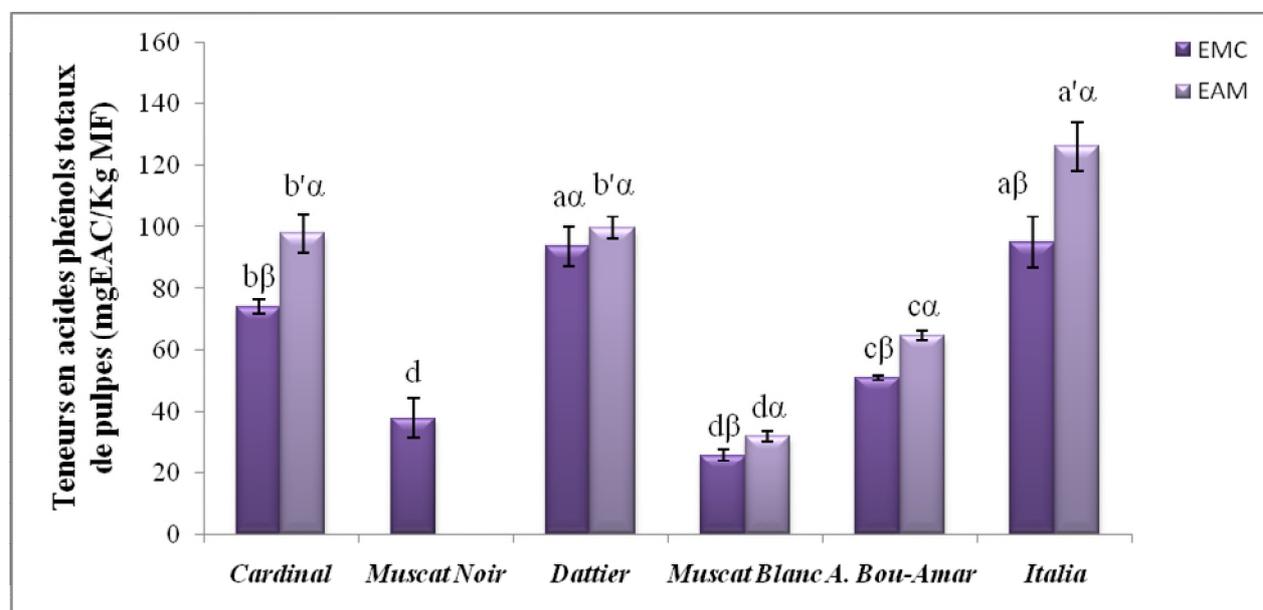


Figure 28: Teneurs en acides phénols totaux des pulpes de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse des résultats indique que les teneurs en acides phénols totaux les plus élevées sont notées dans les extraits obtenus par la technique d'EAM, excepté la variété *Dattier* qui révèle des teneurs statistiquement similaires ($p > 0,05$).

L'étude statistique révèle un effet significatif de la méthode d'extraction sur l'efficacité d'extraction des acides hydroxycinnamique individuels de la pulpe des variétés étudiées. La réponse des différentes molécules détectées vis-à-vis la méthode d'extraction n'est pas identique. Les acides AP1, AP2, A. caftarique, *cis*- et *trans*- coutarique ainsi coumarique sont plus abondant dans les extraits obtenus par la technique d'EAM en comparaison avec la conventionnelle, ce qui nous mène à conclure que ces molécules sont thermorésistantes et/ou sensibles à l'oxydation sous l'effet de l'oxygène durant des longs processus d'extraction. En

effet, l'état frais de la pulpe peut probablement accélérer les réactions du brunissement enzymatique qui induit l'oxydation de ces molécules. Par contre, les acides AP4, et fertarique sont mieux extraits par la méthode conventionnelle. Pas de différences significatives retrouvées entre les deux méthodes d'extraction concernant les acides AP3 et *trans*-coutarique dans le cas du *Muscat Blanc* et *Cardinal*, respectivement. Il est à noter aussi, que les acides coumarique et AP7 sont détectés dans les extraits de la variété *Dattier* obtenus par EAM et non détectés dans ceux obtenus par EMC ; Cela peut être expliqué par une dégradation de ces molécules, qui sont présentes en faibles quantités, durant le long processus d'extraction par EMC (50 min), cette hypothèse peut également expliquer les teneurs plus élevées en certains acides dans les extraits obtenus par EAM par comparaison avec ceux obtenus par EMC.

Ince *et al.* (2013) dans leurs travaux réalisés sur la comparaison entre l'extraction des acides phénols individuels des feuilles de la mélisse, par quatre méthodes d'extraction, ont démontré que l'effet des microondes sur les différents acides phénoliques détectés n'est pas homogène ; les acides syringique, rosmarinique, hydroxycinnamique et *Trans*-3 hydroxycinnamique sont plus concentrés dans l'extrait obtenu par EAM en comparaison avec EMC. Par contre, la teneur en acide vanillique est deux fois plus élevée dans l'extrait obtenu par EMC. D'autre part, il n'y a pas de différence entre les deux méthodes d'extraction concernant les acides caféique et coumarique. De même, Garofulic *et al.* (2013), ont obtenu des teneurs en acide chlorogénique et en acides phénoliques totaux plus élevées dans l'extrait obtenu par EAM en comparaison avec EMC à partir des cerises. Nkhili *et al.* (2009), ont démontré que l'EAM libère mieux les acides hydroxycinnamiques du thé vert en comparaison avec la technique conventionnelle. Cela nous amène à conclure que l'efficacité d'extraction des acides phénols dépend de la molécule en elle-même (thermosensible ou thermorésistante) et/ou de la nature de la matrice végétale, fraîche ou sèche (pulpe et pellicule).

II. Flavonols

II.1. Flavonols de la pellicule

Le profil des flavonols de la pellicule des différentes variétés étudiées est analysé par HPLC-DAD, les chromatogrammes représentatifs ainsi obtenus sont illustrés dans la figure 29. Les résultats du dosage des flavonols individuels des extraits de pellicules, obtenus par les deux méthodes d'extraction étudiées, sont récapitulés dans le tableau XXII. Les résultats montrent que les flavonols varient qualitativement et quantitativement selon les variétés étudiées. 16 composés ont été détectés dans les 6 cépages au total. Le cépage *Cardinal* en renferme le nombre le plus

élevé (14 flavonols), quant le cépage *Italia* n'en contient que 6. Les composés identifiés dans les 6 cépages sont des dérivés du myricétol, quercétol, kaempférol et isorhamnitol en se référant aux standards élués dans les mêmes conditions que les extraits.

Les composés correspondant aux pics 1, 2 et 3 sont des dérivés du myricétol-hexoside qui sont plus présents dans les variétés rouges (*Cardinal* et *Muscat Noir*) que blanches et non détectés dans le cas de la variété *Italia*. D'après les travaux de Castillo-Munoz *et al.* (2009), Rebello *et al.* (2013) et Barcia *et al.* (2014), ces composés correspondent respectivement aux myricétol-3-glucuronide, myricétol-3-galactoside et myricétol-3-glucoside.

Deux pics majoritaires (4 et 5) sont apparus dans tous les chromatogrammes obtenus pour les extraits de pellicules des variétés étudiées. Il est à noter que le pic 4 est un mélange de deux composés type quercétol, présent dans toutes les pellicules sauf dans le cas des variétés *Dattier* et *Ahmar Bou-Amar* pour lesquels qui s'agit d'un seul composé, identifié comme le quercétol-3-rutinoside (rutine). Dans le cas du *Cardinal* et d'*Italia*, le pic 4 correspond à un mélange de rutine et de quercétol-3 galactoside. Quant aux variétés *Muscat Noir* et *Blanc* ce pic correspond à un mélange de rutine et d'un autre quercétol-hexoside (qui ne serait ni un 3-glucoside, ni un 3-galactoside ni encore un 3-glucuronide). Le pic 5 correspond au quercétol-3-glucoside et est détecté dans tous les cépages avec des teneurs qui oscillent entre 723,59 (*Muscat Noir*) et 2344,48 mg/Kg MS (*Cardinal*). C'est le composé le plus abondant après le pic 4 qui représente 40 à 60% de la masse totale des flavonols. Les pics 6 et 7 sont identifiés comme étant des dérivés du quercétol. Un quercétol aglycone a été identifié Au temps de rétention de 26,00 à 26,68 (pic 16), en se basant sur son temps de rétention et le spectre UV-Vis obtenu dans les travaux de Jara-Palacios *et al.* (2014).

Des dérivés d'un troisième type de flavonol « Kaempférol » sont signalés entre les temps de rétention de 17,71 et 19,67 min, dont le premier est identifié comme étant un Kaempférol 3-glucoside qui est présent dans tous les extraits ; son isomère *trans*- est détecté en pic 12 dans l'extrait du *Cardinal*. Le plus abondant des Kaempférol est élué en pic 11 (63 à 74%).

Un isorhamnitol-3-glucoside est détecté dans tous les cépages (pic 13), excepté pour *Italia*. Ce composé est plus abondant dans les deux cépages rouges *Cardinal* et *Muscat Noir*. Un autre dérivé de ce flavonol est signalé dans les extraits des deux cépages rouges mais à faibles concentrations.

Enfin, un flavonol non identifié est détecté dans l'extrait du *Dattier* aux temps de rétention de 22,79 et 23,39 min.

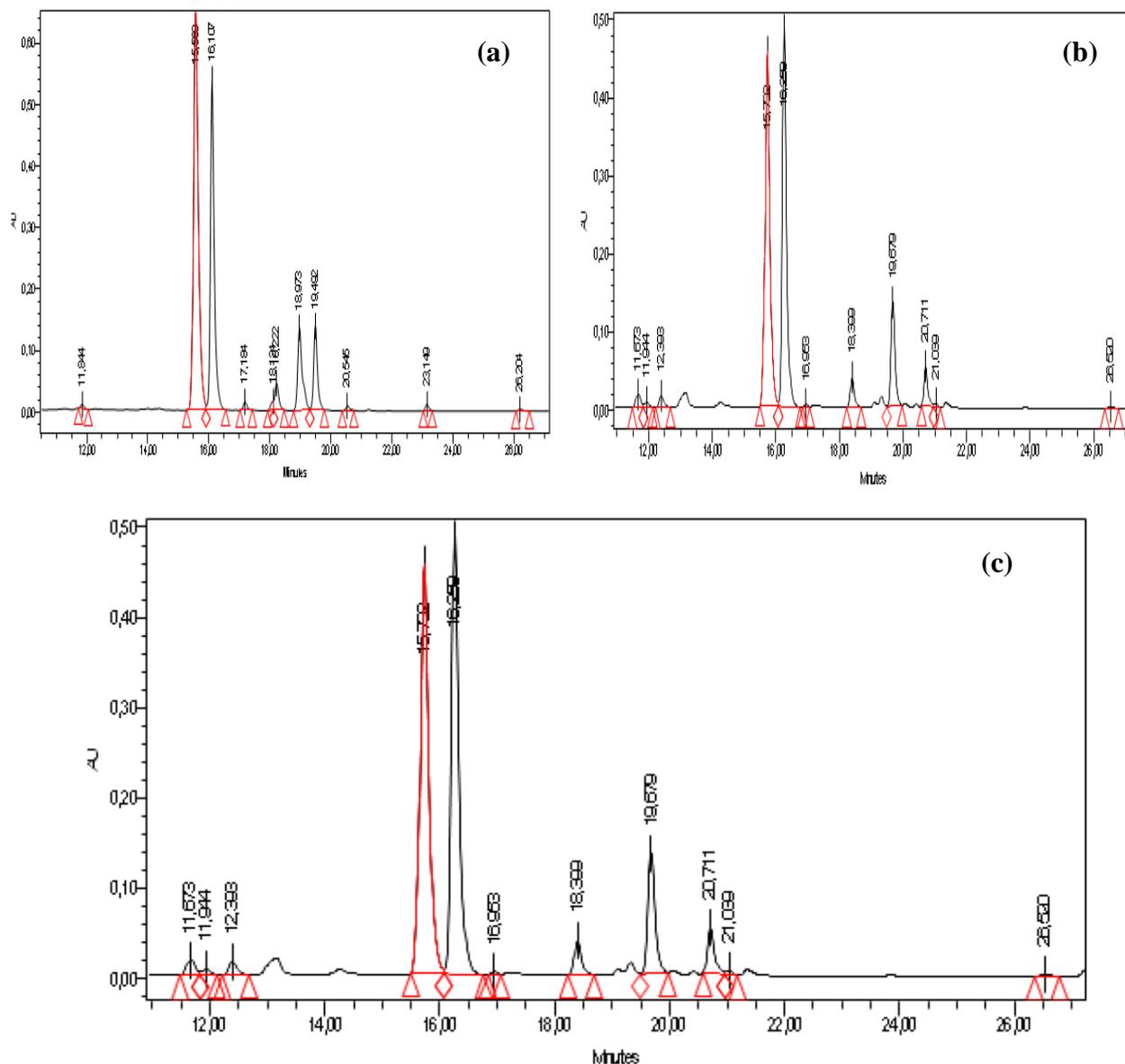


Figure 29 : Chromatogrammes obtenus à 360 nm pour les extraits de pellicules des cépages *Dattier* (a), *Cardinal* (b) et *Muscat Noir* (c).

En résumé, pour la majorité des cépages, le flavonol dominant dans les pellicules des cépages étudiés est du type Quercétol représentant de 78% (*Cardinal*) à 88% (*Italia*) de la teneur totale des flavonols, suivi dans l'ordre décroissant par un flavonol type Kaempférol (6 à 19%) puis Isorhamnitol (0 à 10%) et enfin Myricétol (0 à 3%).

Tableau XXII: Les flavonols individuels détectés dans les extraits de pellicules des raisins étudiés (mg EQ3G/Kg MS).

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
EMC								
Dérivés du Myricétol (M)								
1	M-hexoside1	10,87 à 11,73	88,77 ± 2,9 ^{fb}	32,91 ± 4,37 ^{efα}	Nd	Nd	Nd	Nd
2	M-hexoside2	11,13 à 12,02	30,93 ± 2,15 ^{ip}	41,07 ± 0,33 ^{deα}	23,34 ± 0,51 ^{shijβ}	11,00 ± 2,32 ^{efα}	34,74 ± 0,38 ^{gα}	Nd
3	M-hexoside3	11,57 à 12,47	77,83 ± 0,64 ^{gα}	52,43 ± 1,27 ^{dfβ}	Nd	Nd	Nd	Nd
Dérivés du Quercétol (Q)								
4	Rutine+Q-hexoside	14,83 à 16,01	2566,36±11,24^{αα}	1616,56±19,99^{αα}	3646,96±50,05^{αα}	1518,85±18,28^{αα}	3159,90 ± 57,82^{αα}	1926,46±21,51^{αβ}
5	Q-3-glucoside	15,38 à 16,52	2344,48± 7,54^{ba}	723,59 ± 19,83^{ba}	2343,03±30,64^{ba}	928,77 ± 18,97^{bjβ}	2300,72 ± 41,83^{ba}	1211,73±14,71^{bjβ}
6	Q-hexoside1	16,50 à 16,76	13,64 ± 0,42 ^{la}	10,88 ± 0,63 ^{hija}	53,18± 0,06 ^{fa}	Nd	7,47 ± 0,38 ^{ip}	Nd
7	Q-hexoside2	16,87 à 17,48	Nd	15,39 ± 0,66 ^{hia}	Nd	Nd	Nd	Nd
8	Q-hexoside3	17,60 à 17,70	Nd	Nd	42,49 ± 2,48 ^{fgeα}	Nd	Nd	Nd
17	Q-Aglycone	26,00 à 26,68	13,53 ± 0,50 ^{jb}	4,19 ± 4,19 ^{ija}	11,10 ± 0,27 ^{hiβ}	Nd	Nd	Nd
Dérivés du Kaempférol (Q)								
9	Cis-K 3-G	17,71 à 18,66	173,52 ± 1,11 ^{efβ}	27,76 ± 0,01 ^{fgα}	201,16 ± 3,31 ^{ea}	76,42 ± 0,72 ^{da}	163,26 ± 4,50 ^{dfβ}	76,45 ± 0,05 ^{dfβ}
10	K-hexoside1	18,50 à 19,36	29,49 ± 1,11 ^{ija}	18,41 ± 0,28 ^{shα}	692,49± 12,40^{ea}	18,54 ± 1,57 ^{ea}	57,27 ± 1,29 ^{fa}	22,99 ± 1,01 ^{fa}
11	K-hexoside2	18,76 à 18,91	64,77 ± 1,34 ^{ha}	Nd	Nd	Nd	74,00 ± 1,09 ^{ea}	46,68 ± 1,36 ^{ea}
12	K-hexoside3	19,11 à 19,26	628,39 ± 1,26^{ea}	124,26 ± 2,56 ^{ca}	558,13 ± 4,84 ^{da}	271,22 ± 6,59 ^{ca}	537,96 ± 9,53 ^{ca}	284,29 ± 2,80 ^{efβ}
13	Trans-K-3-G	19,51 à 19,67	22,26 ± 2,38 ^{ka}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Dérivés d'Isorhamnitol (I)								
14	I-3-G	20,03 à 20,86	245,35 ± 1,15^{da}	46,46 ± 0,07 ^{da}	27,88 ± 2,12 ^{shα}	18,86 ± 0,52 ^{ea}	14,30 ± 1,05 ^{ha}	Nd
15	I-hexoside	20,37 à 21,03	24,94 ± 1,56 ^{jka}	8,08 ± 0,76 ^{hijβ}	Nd	Nd	Nd	Nd
16	Flav NI	22,79 à 23,39	Nd	Nd	46,37 ± 3,21 ^{fgα}	Nd	Nd	Nd

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
MAE								
Dérivés du Myricétol (M)								
1	M-hexoside1	10,87 à 11,73	98,64 ± 4,39 ^{fa}	39,11 ± 1,04 ^{fa}	Nd	Nd	Nd	Nd
2	M-hexoside2	11,13 à 12,02	37,85 ± 0,28 ^{ha}	42,92 ± 1,18 ^{ea}	27,45 ± 0,52 ^{sh}	13,26 ± 3,52 ^{fa}	54,70 ± 8,81 ^{fa}	Nd
3	M-hexoside3	11,57 à 12,47	80,47 ± 2,18 ^{ea}	59,10 ± 0,53 ^{da}	Nd	Nd	Nd	Nd
Dérivés du Quercétol (Q)								
4	Rutine+Q-hexoside	14,83 à 16,01	2564,26±24,68^{aa}	1594,60± 3,69^{aa}	3678,29±40,65^{aa}	1499,13 ± 5,64^{aa}	3265,35 ± 28,64^{aa}	1992,65±1,36^{aa}
5	Q-3-glucoside	15,38 à 16,52	2337,56±29,80^{ba}	742,13 ± 0,56^{ba}	2408,98±35,38^{ba}	962,37 ± 3,65^{ba}	2400,72 ± 24,63^{ba}	1262,99±0,64^{ba}
6	Q-hexoside1	16,50 à 16,76	13,17 ± 0,42 ^{ka}	9,07 ± 0,79 ^{jb}	56,06 ± 2,21 ^{fa}	Nd	9,53 ± 10,02 ^{ea}	Nd
7	Q-hexoside2	16,87 à 17,48	Nd	15,23± 0,02 ^{ha}	Nd	Nd	Nd	Nd
8	Q-hexoside3	17,60 à 17,70	Nd	Nd	42,47 ± 4,24 ^{ea}	Nd	Nd	Nd
17	Q-Aglycone	26,00 à 26,68	20,35 ± 1,57 ^{ia}	6,39 ± 1,50 ^{ja}	14,81± 0,96 ^{ia}	Nd	Nd	Nd
Dérivés du Kaempférol (K)								
9	Cis-K 3-G	17,71 à 18,66	179,40 ± 1,09 ^{ea}	28,09 ± 0,45 ^{ea}	200,75 ± 6,48 ^{ea}	67,51 ± 7,70 ^{da}	186,20 ± 6,23 ^{da}	80,19± 1,82 ^{da}
10	K –hexoside1	18,50 à 19,36	30,17 ± 1,11 ^{ha}	16,68± 0,14 ^{hb}	710,74 ± 7,05^{ea}	19,41 ± 0,63 ^{ea}	58,08± 0,13 ^{fa}	21,42 ± 0,16 ^{fa}
11	K –hexoside1	18,76 à 18,91	64,74 ± 2,42 ^{ea}	Nd	Nd	Nd	79,31 ± 0,98 ^{ea}	41,44 ± 3,86 ^{ea}
12	K –hexoside1	19,11 à 19,26	627,21 ± 10,39 ^{ca}	125,34 ± 1,50 ^{ca}	596,14 ± 6,88 ^{da}	264,42 ± 2,86 ^{ca}	555,65 ± 4,92 ^{ca}	291,77 ± 3,64 ^{ca}
13	Trans-K 3-G	19,51 à 20,10	23,30 ± 0,40 ^{hia}	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Dérivés d'Isorhamnitol (I)								
14	I-3-G	20,03 à 20,86	243,08 ± 4,55 ^{da}	5,36 ± 1,06 ^{jb}	31,21 ± 1,23 ^{sh}	21,76 ± 2,81 ^{ea}	14,88 ± 4,79 ^{ea}	Nd
15	I-hexoside	20,37 à 21,03	20,52 ± 0,94 ^{ib}	44,88 ± 1,91 ^{ea}	Nd	Nd	Nd	Nd
16	Flav NI.	22,79 à 23,39	Nd	Nd	40,83 ± 1,73 ^{ga}	Nd	Nd	Nd

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Nd : Non détecté. NI : Non identifié.

Cependant, le *Cardinal* renferme plus de Myricétol (5%) que d'Isorhamnitol (2%) et l'*Italia* est dépourvu de ces deux derniers types de flavonols. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par Perestrelo *et al.* (2012), qui n'ont pas détecté des flavonols du type myricétol et isorhamnitol dans les extraits de pellicules des cépages *Sertical* et *Tinta Negra*.

Les résultats de cette étude concordent avec ceux des travaux antérieurs, qui ont aussi signalé que le flavonol type quercetol est le principal métabolite secondaire de plusieurs cultivars de raisins (Dopico-Garcia *et al.*, 2007 ; Castillo-Munoz *et al.*, 2009 ; Perestrelo *et al.*, 2012). Néanmoins, Lago-Vanzela *et al.* (2011b), Rebello *et al.* (2013) et Barcia *et al.* (2014), ont déterminé des teneurs plus élevées en myricétol, par rapport aux autres types de flavonols, dans les extraits des pellicules des cépages *Bordô* et *Violeta*. Quant à Jara-Palacios *et al.* (2014), indiquent que le kaempférol représente 80% des flavonols de la pellicule du cépage *Zalema*. Ce qui mène à dire que le profil qualitatif de flavonols dépend de la variété.

Des concentrations appréciables en flavonols totaux sont obtenues dans les pellicules des raisins étudiés, les résultats sont montrés dans la figure 30.

L'analyse statistique indique que la pellicule du *Dattier* renferme la teneur la plus élevée statistiquement en flavonols, avec 7676,14 et 7807,73 mg/kg MS obtenus respectivement par EMC et EAM ($p < 0,05$), suivie par celles des cépages *Cardinal* et *Ahmar-Bou Amar*. Les cépages *Muscat Blanc* et *Noir* enregistrent des taux 3 fois plus faibles que celle du cépage *Dattier*, avec des teneurs moyennes significativement similaires ($p > 0,05$) qui sont respectivement, 2721,99 et 2843,66 mg/Kg MS.

Rolle *et al.* (2015), dans leur étude de l'effet de la taille des baies sur le contenu phénolique du cépage *Muscat Hambourg*, ont indiqué des teneurs allant de 483,1 à 524,1 mg EC/kg MF. Une teneur de 153,4 mg/kg de baies est obtenue par Rebello *et al.* (2013) dans le cépage *Violeta* qui correspond à 311,74 mg/Kg MF. Ces résultats sont notablement inférieurs de ceux obtenus dans le présent travail (919,92 à 3276,12 mg/Kg MF). Dans l'étude réalisée par Barcia *et al.* (2014), sur l'effet de la méthode du séchage de la pellicule du cépage *Violeta* sur les différentes classes phénoliques, ont obtenu des teneurs en flavonols totaux varient de 471,7 à 1387,5 mg/Kg MS (dans les échantillons séchés dans une étuve à 50°C et par lyophilisation), respectivement. Jara-Palacios *et al.* (2014), ont enregistré une teneur en flavonols totaux de 1465 mg/Kg MS dans la pellicule du cépage *Zalema*. Perestrelo *et al.* (2012), ont noté des teneurs de 725,6 et 878,3 mg

/kg MS dans les pellicules des cépages *Sertical* et *Tinta Negra*, respectivement. Andjelkovic *et al.* (2013), ont déterminé une concentration en flavonols totaux de 1340 mg/Kg MS dans la pellicule du cépage *Vranac* cultivée en Sibérie. Il convient de noter que les teneurs en flavonols totaux obtenues dans la présente investigation sont plus élevées que précédemment décrits. Ceci peut être expliqué par une différence de climat, de variétés et de méthodes d'extraction.

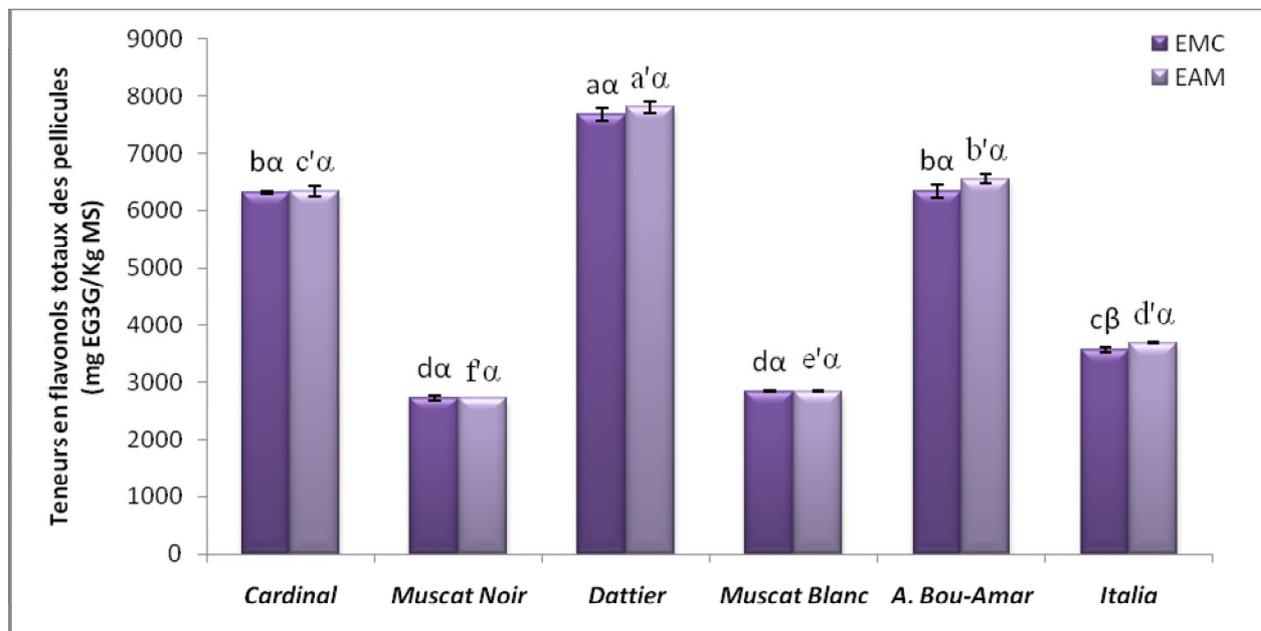


Figure 30: Teneurs en flavonols totaux des pellicules de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

La méthode d'extraction n'a aucun effet significatif sur l'efficacité d'extraction des flavonols totaux des pellicules de la majorité des variétés étudiées, excepté pour la variété *Italia*, où la technique EAM l'affecte positivement. Il est à noter que le flavonol dominant de cette variété (49% ; « mélange de Quercetol 3-rutinoside + Quercetol 3-galactoside »), est positivement affecté par cette technique, ce qui explique son effet sur la concentration totale.

Il est important aussi de souligner que l'effet de la technique d'extraction dépend du type de flavonol et de la variété. En effet, les Myricétols-hexoside 1 et 2 détectés dans le cas du *Cardinal* et du *Dattier*, sont significativement mieux extraits par la chaleur engendrée par les microondes,

de même pour les composés Quercetol-hexoside1, Quercetol-aglycone et *cis*-Kaempférol-3-G. Par contre, dans le cas du *Muscat Noir*, le Quercetol-hexoside1 ainsi que l'Isorhamnitol-3-G sont mieux récupérés par la méthode conventionnelle, mais comme ces composés représentent des proportions faibles, la teneur totale en flavonol n'est pas significativement affectée par la méthode d'extraction.

II.2. Flavonols de la pulpe

Cinq flavonols sont détectés dans les extraits de la pulpe des différents cépages. Les chromatogrammes obtenus sont illustrés dans la figure 31. Les résultats des teneurs en flavonols individuels des pulpes analysées par les deux méthodes d'extraction sont regroupés dans le tableau XXII. Les résultats indiquent que la teneur en flavonols individuels varie d'un cépage à un autre. Il est à signaler, que la pulpe des variétés étudiées ne contient pas de Myricétol ni de Kaempférol ; ce dernier n'est mesuré qu'à très faible concentration dans le cas du *Dattier* extrait par EAM. Le flavonol dominant est de type Quercetol qui représente 69-100% de la teneur totale en flavonols.

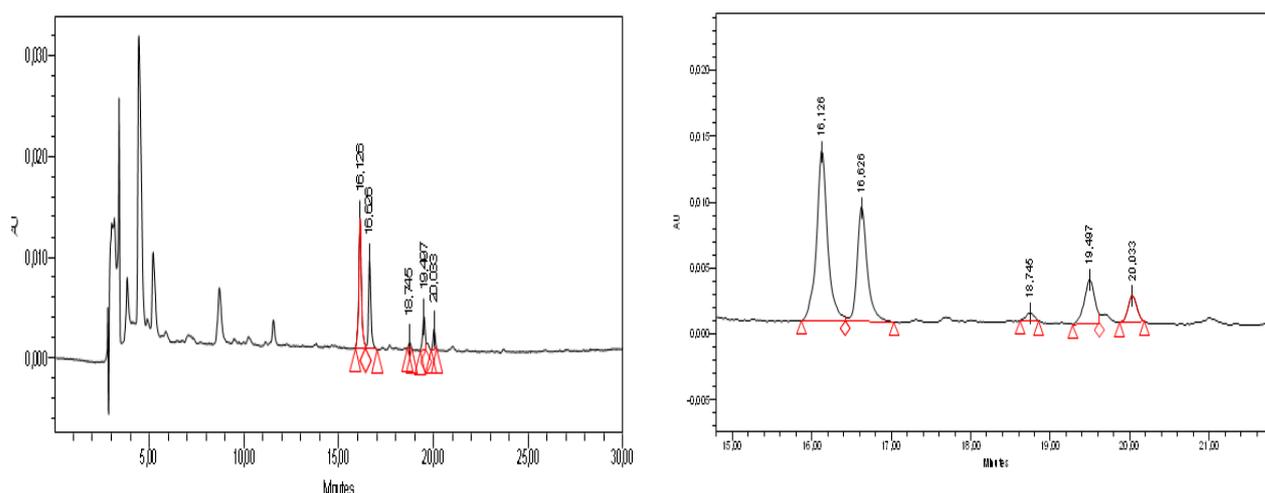


Figure 31 : Chromatogramme obtenu à 360 nm pour l'extrait de la pulpe du cépage *Dattier*.

La concentration totale (fig. 32) est la plus élevée pour le cépage *Dattier* (23,46 et 27,38 mg/kg MF, obtenus par EMC et EAM, respectivement), avec une différence non significative dans le cas d'EAM avec le *Cardinal* (16,05 et 25,08 mg/kg MF, obtenus par EMC et EAM, respectivement) en deuxième groupe viennent les deux cépages *Ahmar Bou-Amar* et *Italia* avec des teneurs statistiquement similaires (14,99-18,80 et 13,44-16,82 mg/kg MF, obtenus par EMC et EAM, respectivement). La présence des flavonols dans la pulpe des cépages *Muscat Noir* et *Blanc* n'est qu'à l'état de trace.

Tableau XXIII: Les flavonols individuels détectés dans les extraits de pulpes des raisins étudiés (mg EQ3G/Kg MF).

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	Ahmar Bou-Amar	Italia
EMC								
Dérivés du Quercétol								
1	Quercetol 3-glucoside	15,38 à 16,52	3,73 ± 0,05 ^{bp}	0,47 ± 0,02 ^b	13,35 ± 0,14^{aa}	2,33 ± 0,10^{aa}	7,43 ± 0,47^{ab}	7,34 ± 0,16^{aa}
2	Quercetol –hexoside1	16,50 à 16,76	7,32 ± 0,82^{aa}	0,79 ± 0,02^a	6,69 ± 0,71 ^{ba}	2,04 ± 0,18^{ab}	6,51 ± 0,51 ^{ba}	5,37 ± 1,06 ^{bp}
Dérivés d'Isorhamnitol								
3	Isorhamnitol –hexoside1	20,03 à 20,86	2,50 ± 0,10 ^{cb}	Nd	2,28 ± 0,45 ^{cb}	0,53 ± 0,06 ^{ba}	1,06 ± 0,06 ^{cb}	0,73 ± 0,15 ^{cb}
4	Isorhamnitol –hexoside2	20,37 à 21,03	2,49 ± 0,06 ^{cb}	Nd	1,14 ± 0,27 ^{db}	Nd	Nd	Nd
EAM								
Dérivés du Quercétol								
1	Quercetol 3-glucoside	15,38 à 16,52	7,65 ± 1,23 ^{ba}		13,59 ± 0,79^{aa}	1,29 ± 0,11^{aa}	8,96 ± 0,19^{aa}	8,29 ± 0,40^{aa}
2	Quercetol –hexoside1	16,50 à 16,76	10,70 ± 0,93^{aa}		8,05 ± 0,11 ^{ba}	0,77 ± 0,19 ^{ba}	8,41 ± 0,20 ^{ba}	6,76 ± 1,30 ^{ba}
Dérivés du Kaempférol								
3	Kaempférol –hexoside1	18,76 à 18,91	Nd		0,52 ± 0,05^{da}	Nd	Nd	Nd
Dérivés d'Isorhamnitol								
4	Isorhamnitol –hexoside1	20,03 à 20,86	3,08 ± 0,04 ^{ca}		3,39 ± 0,24 ^{ca}	0,14 ± 0,14 ^{ca}	1,43 ± 0,03 ^{ca}	1,76 ± 0,29 ^{ca}
5	Isorhamnitol –hexoside2	20,37 à 21,03	3,66 ± 0,24 ^{ca}		1,83 ± 0,23 ^{da}	Nd	Nd	Nd

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : Temps de Rétention. Nd : Non détecté.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans d'autres travaux. En effet, seulement 2,4 mg/kg de baies ont été obtenues par Rebello *et al.* (2013) dans la pulpe du cépage *Violeta* qui correspond à 4,62 mg/ Kg MF, dont 47% sont du type Quercétol et 29% sont du type Myricétol. De même, Ramirez-Lopez *et al.* (2014), dans le jus de raisin variété *Cynthiana* n'ont détecté que des traces de Kaempférol, d'Isorhamnitol et de Quercétol.

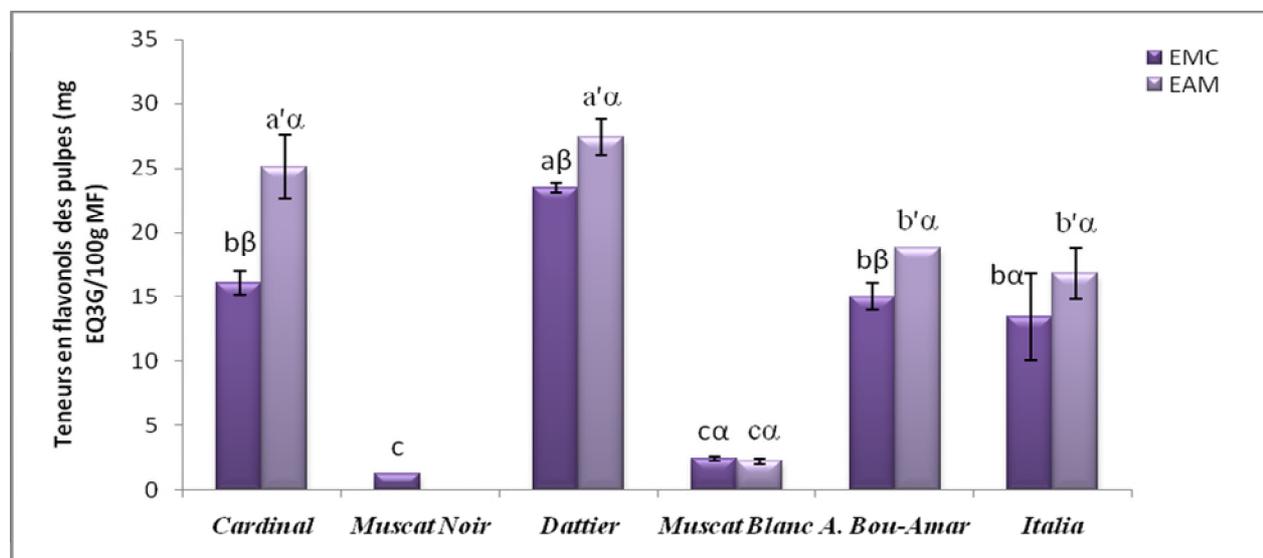


Figure 32 : Teneurs en flavonols totaux des pulpes de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse des résultats indique que la technique EAM affecte positivement et significativement la teneur en flavonols individuels et totaux selon les cépages. En effet, la récupération des flavonols individuels par la technique citée est de 14 (*Dattier*) à 36% (*Cardinal*) plus importante que l'extraction classique. Cependant, dans le cas des cépages *Muscat Blanc* et *Italia*, le taux d'extraction des flavonols totaux et individuels obtenus avec les deux méthodes d'extraction ne présente aucune différence significative.

D'après les résultats obtenus par Ince *et al.* (2013), la Naringénine est significativement plus extraite par le procédé de la macération, par contre l'Hesperidine est significativement plus extraite par l'EAM. La Naringénine est seulement récupérée par la seconde extraction. De même, Sveltana et Dorina (2013), ont obtenu à partir des feuilles de *Ficus Carica* des rendements élevés en Kaempférol et en

rutine en utilisant les microondes comme moyen d'extraction comparativement à l'EMC pendant trois jours.

Les résultats obtenus par Min-Jing *et al.* (2004), dans leur étude comparative entre des méthodes d'extraction à partir d'une plante médicinale, indiquent que le rendement d'extraction de la rutine et de la quercétine avec l'EAM est plus élevé que celui obtenu par l'extraction au soxhlet (8h).

III. Tanins

III.1. Tanins des pellicules

Les chromatogrammes illustrés dans la figure 33, représentent les monomères de flavan-3-ols, constituant les unités de bases des proanthocyanidines (tanins condensés), obtenus après thiolysse des extraits de la pellicule des cépages étudiés.

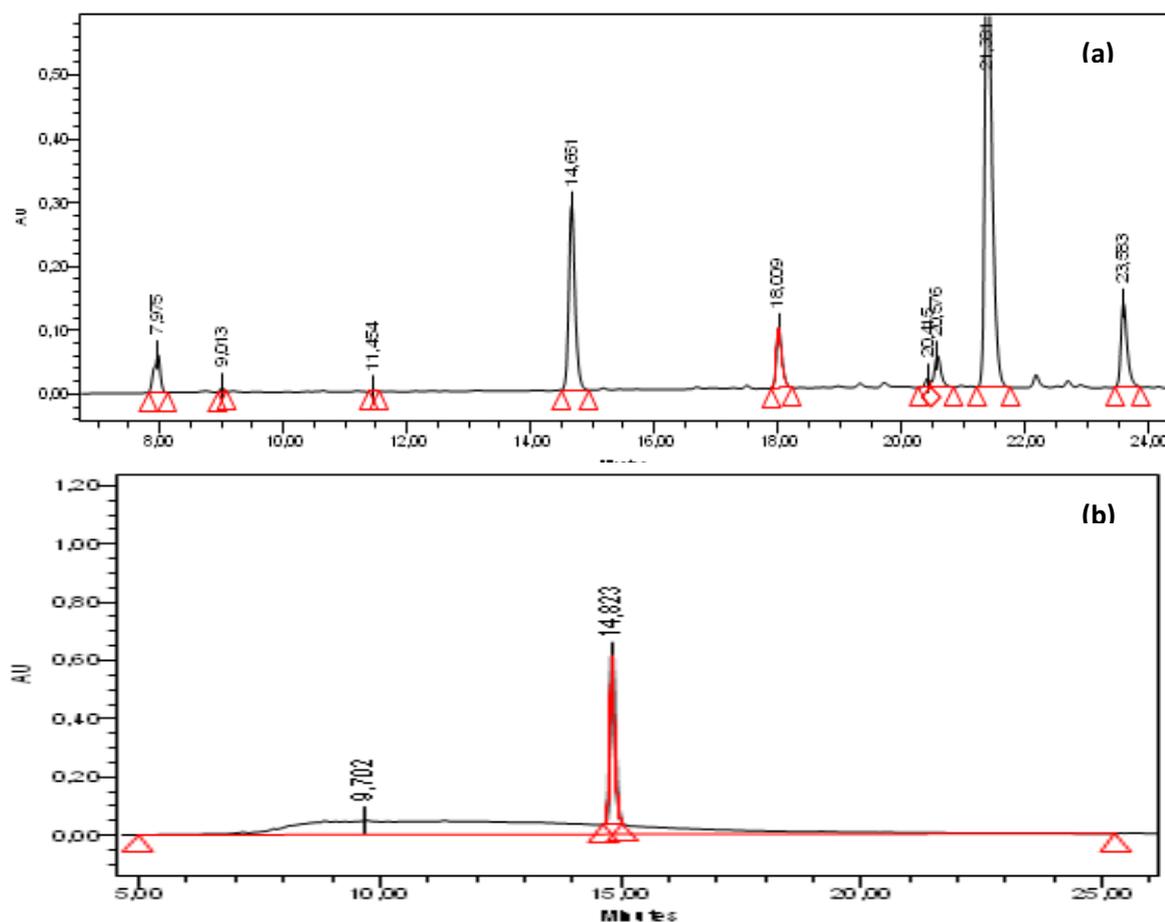


Figure 33 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits de la pellicule du cépage *Italia* avec thiolysse (a) et sans thiolysse (b).

Les pics révélés à 14,66 et 14,82 min s'agit de l'étalon interne.

Le tableau XXIV récapitule les teneurs en tanins individuels dosés dans les extraits des pellicules obtenus avec les deux méthodes d'extraction. Huit monomères de tanins sont caractérisés dans la pellicule des raisins analysés, dont leurs teneurs varient significativement selon les variétés et la méthode d'extraction.

Dans la pellicule quel que soit le cépage, l'Epicatechine-SH est le monomère dominant (représente 53 à 72% des tanins selon les cépages) avec une teneur moyenne de 9921,54 (*Italia*) et 17125,92 mg/Kg MS (*Muscat Noir*), Epigallocatechine-SH vient en deuxième position occupant 15 à 30% de la teneur totale en tanins selon les cultivars. La troisième position est occupée par la Catéchine, sauf les variétés *Muscat Blanc* et *Ahmar Bou-Amar* dont elle est classée en 4^{ème} position après Epicatechine-3-O-Gallate-SH. En résumé, les dérivés d'Epicatechine sont les majoritaires dans toutes les variétés, qui représentent 74% (*Ahmar Bou-Amar*) à 84% (*Dattier*) de la teneur totale en tanins, quant aux dérivés de la Catéchine, ils représentent 10 à 16% de la concentration totale. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Jara-Palacios *et al.* (2014); ces auteurs indiquent que les dérivés d'Epicatechine sont les plus abondants dans les pellicules et les pépins de raisins.

Les résultats relatifs à la proportion des différentes fractions de tanins des pellicules des cépages étudiés, au degré de galloylation ainsi qu'au degré de polymérisation moyen (DPm) sont rassemblés dans le tableau XXV. La proportion entre ces unités est différente entre les variétés. Une de ces unités est spécifique de la pellicule, l'Epigallocatechine, tandis qu'une seconde, l'Epicatechine-3-gallate, est présente essentiellement dans les pépins (Cadot, 2008). La proportion d'Epigallocatechine (%EGC) dans la pellicule des variétés étudiées varie significativement de 13% (*Muscat Blanc*) à 29% (*Ahmar Bou-Amar*). Le degré de galloylation (%EGC) des pellicules est faible, il est compris entre de 3% et 7%, selon les cépages et la méthode d'extraction. Les résultats indiquent que les valeurs du degré moyen de polymérisation (DPm) varient de 11,6 à 25, selon les cépages. Selon (Jordão et Correia, 2012), les tanins des pellicules se présentent sous formes polymériques (DPm > 12-15). Le *Muscat blanc* et *Ahmar Bou-Amar* présentent le DPm le plus élevé dans les pellicules, ce qui explique leur caractère d'astringence. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Cadot (2008), qui a obtenu pour le *Cabernet Franc* un %EGC de 3 à 6%, %EGC de 30 à 50% et un DPm de 25 à 30. Les travaux de Mané *et al.* (2007) sur trois variétés de raisin, montrent des DPm de 23 (*Chardonnay*) à 39 (*Pinot Noir*), des %EGC de 9,6 et 14,5 et des %EGC de 1,13 et 1,8. Quant à Lago-Vanzela *et al.* (2011), ils montrent des DPm et %EGC respectivement de 12,29 et 1,4% pour le cépage *Bordô*. Chaque cépage possède une composition en polyphénols caractéristique. Sans oublier l'effet du climat, du sol et de la région (Cadot, 2008).

La figure 34 illustre les teneurs totales en tanins condensés obtenus avec les deux méthodes d'extraction. Les résultats indiquent que le cépage *Muscat Noir* renferme la concentration la plus élevée en tanins totaux (30214,00 mg EC/Kg MS), tandis que, la teneur la plus faible est révélée pour le cépage *Muscat Blanc* (16532,78 mg EC/Kg MS). L'analyse statistique a permis de classer les différentes variétés selon leur contenu de leurs pellicules en tanins totaux dans l'ordre décroissant suivant :

Muscat Noir > *Cardinal* > *Ahmar Bou-Amar* > *Dattier* = *Muscat Blanc* = *Italia*.

Des variations importantes ont été rapportées dans la littérature concernant les teneurs en proanthocyanidines des pellicules de raisin. Barcia *et al.* (2014), ont obtenu des concentrations de 9210 et 19550 mg /Kg MS dans les pellicules du cépage *Violita* séchées dans l'étuve à 50°C et lyophilisées, respectivement. Les résultats de la présente étude sont relativement proches des résultats enregistrés par ces auteurs, excepté les cépages *Muscat Noir* et *Cardinal*.

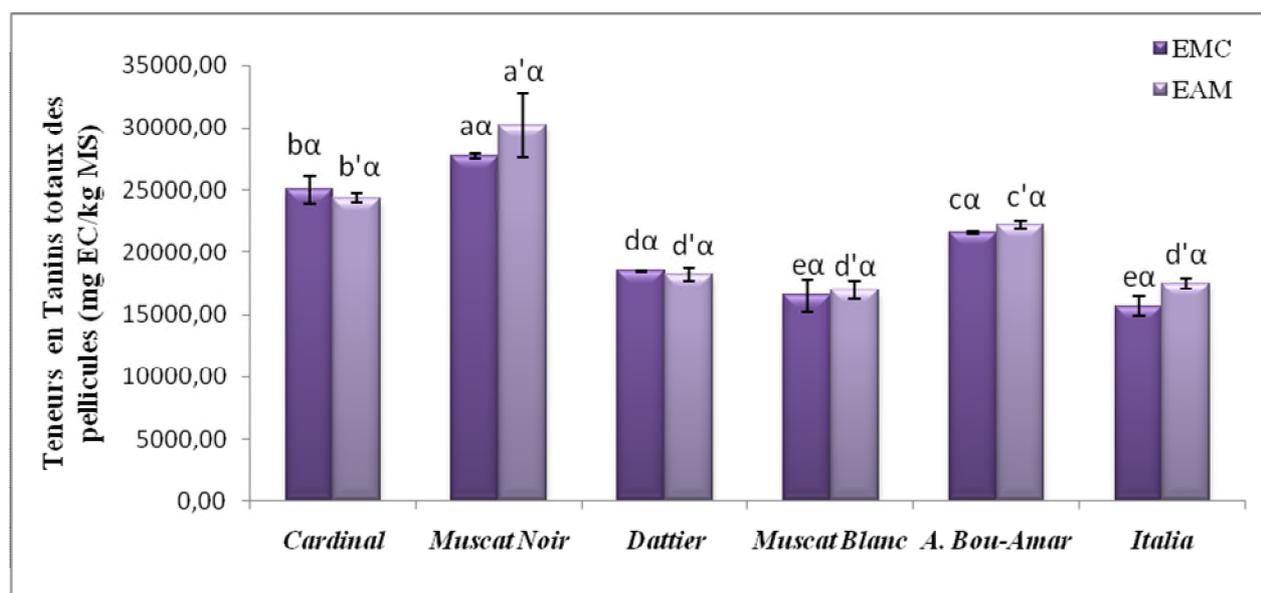


Figure 34: Teneurs en tanins totaux des pellicules de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Tableau XXIV: Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pellicules des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
EMC								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	1567,53 ± 31,59^{cdα}	2005,74 ± 121,77^{ca}	1254,61 ± 10,60^{ca}	560,03 ± 37,37 ^{da}	853,47 ± 18,01 ^{dfβ}	928,79 ± 68,57^{efβ}
2	Epicatechine(EC)	9,01 à 9,33	248,18 ± 47,39 ^{fb}	284,58 ± 77,52 ^{fgα}	163,10 ± 0,19 ^{fb}	78,29 ± 10,36 ^{fb}	59,85 ± 0,28 ^{efβ}	97,15 ± 10,76 ^{da}
3	Epicatechine-O-3gallate (ECG)	11,44 à 11,98	59,02 ± 8,75 ^{fa}	44,87 ± 11,67 ^{ia}	15,47 ± 0,54 ^{ga}	45,34 ± 0,56 ^{ga}	32,55 ± 1,06 ^{efβ}	12,63 ± 2,61 ^{da}
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81 à 18,90	3920 ± 15,16^{ba}	5458,82 ± 183,81^{ba}	4236,44 ± 35,09^{ba}	2376,76±157,87^{ba}	6163,51± 131,56^{ba}	3309,39±205,41^{aa}
5	Catéchine-SH Cis (C-SH)	19,74 à 20,34	129 ± 6,31 ^{fa}	218,49 ± 7,96 ^{ghα}	38,84 ± 22,11 ^{ga}	90,98 ± 2,25 ^{efβ}	1471,55 ± 36,21 ^{ca}	95,08 ± 17,34 ^{dfβ}
6	Catéchine-SH Trans (C-SH)	20,57 à 21,12	1107,87± 112,98 ^{fa}	1452,64± 104,03 ^{da}	804,30 ± 0,07 ^{ca}	791,57 ± 74,45 ^{ca}	82,58± 60,21 ^{efβ}	620,77 ± 11,18 ^{ca}
7	Epicatechine-SH (EC-SH)	21,36 à 21,80	16296,70±759,99^{aa}	17125,92± 55,01^{aa}	11091,62 ±59,85^{aa}	1190,08±935,77^{ba}	11390,17±128,82^{aa}	9921,54±483,45^{aa}
8	Epicatechine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56 à 23,94	1708,02± 76,33^{deα}	1196,37 ± 261,50 ^{ca}	893,17 ± 0,07 ^{da}	685,70 ± 68,20^{ca}	1516,94 ± 128,82^{ca}	705,11± 6,69 ^{ca}

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
MAE								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	1661,04 ± 14,06^{ca}	2343,61±252,50^{ba}	1350,51± 23,17^{ca}	647,66 ± 67,80^{ca}	1764,66 ± 23,76^{ca}	957,33 ± 70,99^{ca}
2	Epicatechine(EC)	9,01 à 9,33	179,66± 5,85 ^{fa}	203,73±23,67 ^{fa}	107,52 ± 0, 16 ^{ca}	36,93 ±0,47 ^{fa}	75,72 ± 1,02 ^{fa}	72,81± 2,01 ^{fa}
3	Epicatechine-0-3gallate (ECG)	11,44 à 11,98	43,11 ± 2,73 ^{gb}	37,72 ±7,43 ^{ga}	12,21 ± 1,07 ^{gb}	Nd	21,35 ± 0,28 ^{gb}	22,40 ± 7,23 ^{gb}
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81 à 18,90	4098,73 ± 35,39^{bb}	6200,71±536,70^{ca}	4341,11 ± 93,69^{bb}	2209,06±120,57^{bb}	4434,80 ± 59,73^{bb}	4632,35±999,60^{ba}
5	Catéchine-SH Cis (C-SH)	19,74 à 20,34	106,39 ± 1,92 ^{gb}	226,72±14,12 ^{fa}	73,88± 0,32 ^{fa}	131,07 ± 0,45 ^{ca}	204,51 ± 2,75 ^{gb}	232,30 ± 77,82 ^{ca}
6	Catéchine-SH Trans (C-SH)	20,57 à 21,12	917,57± 22,54 ^{gb}	1453,17±107,83 ^{da}	721,49 ± 8,30 ^{db}	691,18 ± 16,37 ^{ca}	623,21 ± 8,39 ^{da}	411,95± 242,65 ^{ca}
7	Epicatechine-SH (EC-SH)	21,36 à 21,80	16238,88±143,22^{aa}	18839,33±1662,47^{aa}	10842,65±346,91^{aa}	11094,97±69,95^{ca}	14384,81±193,73^{ab}	10453,02±313,45^{aa}
8	Epicatechine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56 à 23,94	1162,08± 111,23 ^{db}	909,01 ± 15,42 ^{ca}	738,85± 34,66 ^{db}	434,72 ± 86,53 ^{db}	655,33± 8,82 ^{db}	677,40 ± 39,68 ^{da}

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : Temps de Rétention. Nd : Non détecté.

ableau XXV : Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPM) des pellicules des cépages étudiés.

Cépages	Méthode d'extraction	Dérivés Catéchine (%)	Dérivés Epicatéchine (%)	Dérivés Epicatéchine-3-O-Gallate (%)	% EGC	DPM
<i>Cardinal</i>	EMC	11,2 ± 0,12	66,06 ± 0,43	7,06 ± 0,04	15,68 ± 0,04	13,36 ± 0,06
	EAM	11 ± 0,01	67,27 ± 0,31	4,93 ± 0,37	16,79 ± 0,37	12,96 ± 0,13
<i>Muscat Noir</i>	EMC	13,23 ± 0,13	62,66 ± 0,00	4,46 ± 0,94	19,65 ± 0,94	11,9 ± 0,26
	EAM	13,31 ± 0,10	63,02 ± 0,06	3,15 ± 0,19	20,52 ± 0,19	11,72 ± 0,29
<i>Dattier</i>	EMC	11,34 ± 0,04	60,84 ± 0,14	4,91 ± 0,06	22,9 ± 0,06	12,91 ± 0,13
	EAM	11,8 ± 0,15	60,2 ± 0,23	4,13 ± 0,07	23,87 ± 0,07	12,37 ± 0,16
<i>Muscat Blanc</i>	EMC	8,72 ± 0,01	72,47 ± 0,08	4,42 ± 0,06	14,39 ± 0,06	25,01 ± 0,63
	EAM	9,64 ± 0,11	72,99 ± 0,44	2,88 ± 0,69	14,49 ± 0,69	22,39 ± 1,2
<i>Ahmar Bou-Amar</i>	EMC	11,16 ± 0,15	53,08 ± 0,02	7,19 ± 0,62	28,57 ± 0,62	22,81 ± 0,32
	EAM	11,7 ± 00	65,24 ± 00	3,05 ± 00	20,01 ± 00	11,91 ± 0,00
<i>Italia</i>	EMC	10,48 ± 0,09	63,86 ± 0,18	4,58 ± 0,16	21,08 ± 0,16	15,12 ± 0,12
	EAM	9,21 ± 1,57	60,36 ± 3,23	4,01 ± 0,28	26,41 ± 0,82	16,67 ± 1,38

EMC : Extraction par Macération conventionnelle ; EAM : Extraction Assistée par Microondes.

Dans l'étude menée par Mané *et al.* (2007), sur trois cépages *Pinot Noir*, *Pinot Meunier* et *Chardonnay*, les auteurs ont notés des teneurs totales en flavanols, dans les pellicules de ces variétés respectivement, de 30000, 24000 et 21000 mg/Kg MF, qui sont largement supérieures de celles obtenues dans la présente étude (6039,41-9774,23 mg/Kg MF, dans les cépages *Muscat Blanc* et *Noir*, respectivement).

Cependant, nos résultats sont supérieurs de ceux obtenus par plusieurs auteurs. Selon Jara-Palacios *et al.* (2014), les pellicules de la variété *Zalema* contiennent 1219,0 mg/Kg MS. Aussi, Rebello *et al.* (2013), ont indiqué que les pellicules de la variété *Violeta* renferment 1463,04 mg/kg MS en proanthocyanidines. Perestrelo *et al.* (2012), ont enregistré dans les extraits des pellicules des variétés *Sercial* et *Tinta Negra* des teneurs de 92,5 et 152,8 mg/Kg MS. Seuls 45 mg/Kg MS de la concentration totale en tanins ont été trouvés par Andjelkovic *et al.* (2013) dans l'extrait de la pellicule de la variété *Vranac* en provenance de Sibérie.

L'étude statistique indique que la méthode d'extraction affecte l'extraction de certains monomères de flavan-3-ols, avec des degrés différents selon le cépage, soit positivement ou négativement selon le composé en question. Il est important de noter que la technique EAM affecte positivement l'extraction de la Catéchine à partir de la majorité des extraits (sauf *Muscat Noir* et *Italia*, effet est non significatif). L'effet des microondes sur l'Epicatéchine et Epigallocatechine est variable selon les cultivars ; un effet négatif est observé dans la majorité des cas et un effet positif dans le cas d'*Ahmar Bou-Amar*. La teneur en Epigallocatechine est réduite de 100% dans l'extrait du *Muscat Blanc*, mais mieux récupérée dans le cas d'*Ahmar Bou-Amar* et *Italia* (34 et 43%, respectivement).

L'effet des microondes sur l'Epigallocatechine-SH est différent selon les variétés ; un effet positif dans le cas des cépages *Cardinal* (4%) et *Muscat Noir* (14%) mais un effet non significatif dans les autres cépages, excepté *Ahmar Bou-Amar* dont l'effet est négatif (une réduction de 28%). Concernant le composé dominant « Epicatéchine-SH », il est mieux récupéré par la technique EAM dans le cas d'*Ahmar Bou-Amar* (26%), et l'effet est non significatif pour les autres variétés. Cependant, Epicatéchine-3-O-Gallate-SH est affectée négativement quelle que soit la variété, une réduction de 17% (*Dattier*) à 57% (*Ahmar Bou-Amar*) est observée. Il apparait aussi que l'extraction par microondes réduit les teneurs en *cis*- et *trans*- Catéchine-SH dans la majorité des cépages.

Dans le présent travail nous suggérons que la Catéchine nécessite une chaleur pour être extraite au maximum et/ou est très sensible à l'oxygène et à la lumière.

Un rendement de deux fois plus élevé en Catéchine est obtenu par Quan *et al.* (2006) dans l'extrait de thé en utilisant les microondes comme moyen d'extraction, en comparaison avec l'extraction par macération à une température ambiante. Les mêmes constatations sont notées par Pak-Dek *et al.* (2011) dans leur étude comparative entre quatre méthodes d'extraction à partir des extraits de feuilles de *Morinda Citrifolia* ; des teneurs en Catéchine de 72,86 dans le cas d'une extraction assistée par microondes contre 46,54 mg/g d'extrait obtenu par macération. Par contre, selon les résultats obtenus par Ince *et al.* (2013), La catéchine est dégradée par la chaleur engendrée par les microondes ; elle est 3 fois plus faible dans l'extrait obtenu par EAM en comparaison avec la macération.

III.2. Tanins des pépins

Les pépins sont la source la plus importante en monomères de flavan-3-ols dans les raisins (Guerrero *et al.* 2009). Huit monomères de flavan-3-ols sont détectés dans les extraits de pépins analysés, les chromatogrammes obtenus sont illustrés dans la figure 35. Les résultats du dosage des composés individuels obtenus avec les deux méthodes d'extraction sont regroupés dans le tableau XXVI.

Le profil quantitatif des proanthocyanidines diffère significativement selon la variété et la méthode d'extraction. Le monomère flavan-3-ol dominant pour toutes les variétés est l'Epicatechine-SH avec une proportion d'environ 44% (*Muscat Blanc* : 10439,2 mg/Kg MS) à 51% (*Cardinal* : 42444,6 mg/Kg MS), suivi par l'Epicatechine-3-O-Gallate-SH (17 à 23% selon les variétés) puis la Catéchine (12 à 17%), sauf dans le cas du *Dattier* la teneur en catéchine (environ 15%) est plus importante que l'Epicatechine-3-O-Gallate-SH (12%). L'ordre des autres monomères est en fonction du cépage. Les résultats relatifs à la proportion des dérivés de Catéchine, d'Epicatechine et galloylés des tanins des pépins des cépages étudiés ainsi que le degré de polymérisation moyen (DPM) sont regroupés dans le tableau XXVII. Ces résultats révèlent, quelle que soit la variété étudiée, que les dérivés d'Epicatechine représentent la proportion la plus importante de 48 (*Muscat Blanc*) à 59% (*Cardinal*). Ces résultats concordent avec ceux de Baiano et Terracone (2011), d'Andjelkovic *et al.* (2013) et de Jara-Palacios *et al.* (2014), qui indiquent que le monomère dominant dans les pépins de raisin est l'Epicatechine dans les variétés *Baresana*, *Vranac* et *Zalema*, respectivement. Ceci est moins vrai pour les

cépages *Cardinal* et *Alphonse Lavallée* étudiées par Topalovic *et al.* (2012). La proportion des EGC est très faible, dans les extraits des pépins, voir absente dans certains cépages (de 0 à 1,57%). Cependant, la proportion d'Epicatechine-3-O-gallate (%ECG) varie significativement de 24 à 30% et occupe la deuxième position dans la concentration totale en tanins pour la majorité des cépages, ces résultats sont en accord avec ceux de Souquet *et al.* (2000).

Les valeurs du degré moyen de polymérisation (DPm) varient de 2,02 à 6,1 selon les cépages et la méthode d'extraction. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés dans la littérature. Selon les travaux de Cadot (2008) sur la variété *Cabernet franc*, la proportion d'Epicatechine-3-O-gallate est entre 20 à 30% alors que l'Epigallocatechine est absente des tanins des pépins, le DPm pour cette variété est de 6 à 10. Aussi, Mané *et al.* (2007), ont enregistré des valeurs de 2,9 (*Pinot Noir*) à 4,24 (*Chardonnay*) de DPm; 9,5 % d'Epicatechine-3-O-gallate (*Pinot Noir*) à 13,2% (*Pinot Meunier*) et enfin, 0% d'Epigallocatechine pour les 3 variétés. Le degré moyen de polymérisation (DPm) nous renseigne sur la longueur moyenne des polymères de tanins condensés. Plus le polymère est grand, plus l'astringence augmente Cadot (2008).

D'après Jordão et Correia (2012), les tanins des pépins sont sous formes monomériques et oligomériques. Le degré de galloylation nous renseigne sur le taux d'unités d'Epicatechine-O-gallate. L'étude a confirmé que les tanins contenus dans la pellicule des baies sont plus polymérisés et plus complexes (DPm des tanins des pellicules > DPm de ceux des pépins) que les tanins contenus dans les pépins. Ainsi, les tanins de pellicules devraient donc être plus astringents que les tanins de pépins, ce qui n'est pas le cas. En effet, la taille des tanins ne serait pas le seul paramètre influant sur leur astringence.

Les monomères sont plus amers qu'astringents, et l'astringence augmente avec le degré de polymérisation. L'effet de la galloylation sur l'astringence est moins connu, néanmoins Ricardo-da-Silva *et al.* (1991) et Cheynier *et al.* (1997), ont montré que la galloylation augmentait les interactions tanins-protéines, et par ailleurs, Brossaud *et al.* (2001), ont montré des relations entre astringence et % de galloylation. Ainsi, Cadot (2008) propose t'il un modèle incluant ces deux notions « DPm » et % galloylation », permettant d'expliquer le caractère nettement « rugueux » des tanins des pépins en dépit d'un DPm sensiblement plus faible.

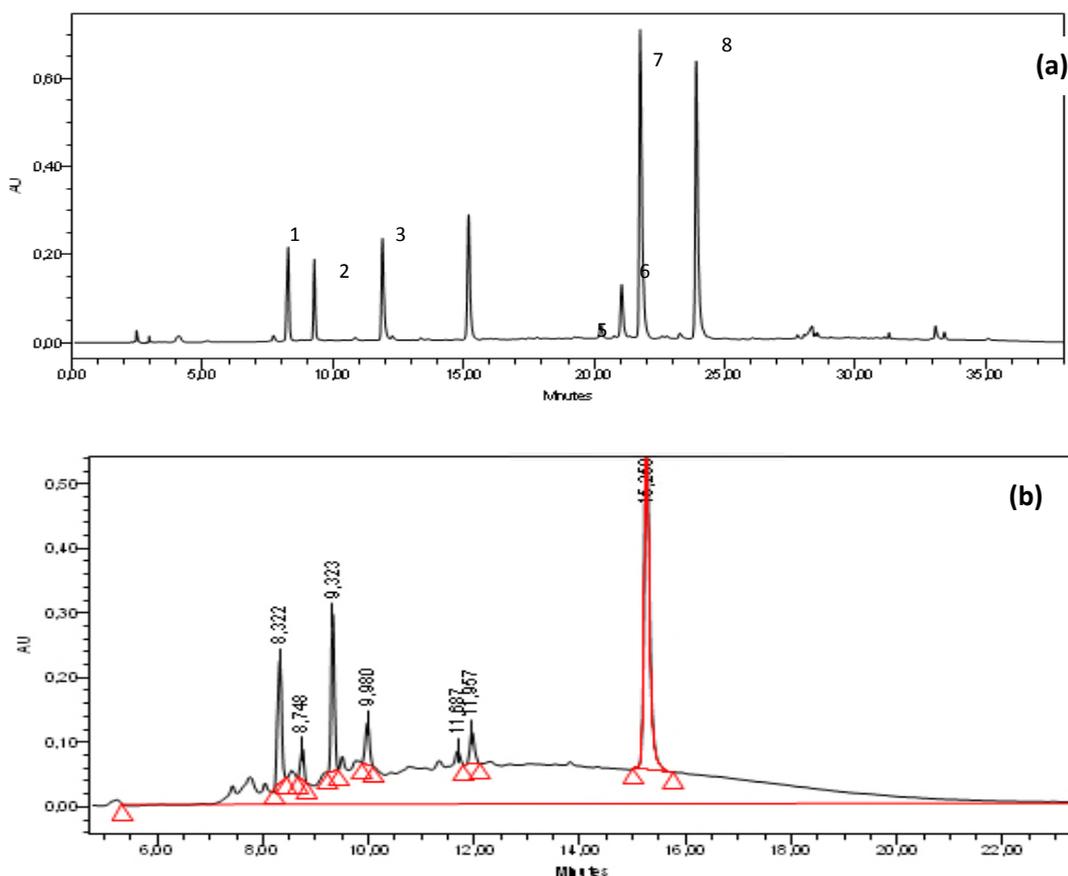


Figure 35 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits des pépins du cépage *Italia* avec thiolysé (a) et sans thiolysé (b).

Les pics révélés aux environs de 15 min s'agit de l'étalon interne.

La figure 36 montre les teneurs en tanins condensés totaux obtenues pour chaque variété avec les deux méthodes d'extraction.

La concentration totale la plus élevée en ces composés est révélée dans les extraits des pépins de la variété *Italia* avec une teneur moyenne de 94994,3 et 70238,9 mg/Kg MS, obtenues avec EMC et EAM, respectivement. En deuxième position vient la variété *Muscat Noir* avec une teneur de 75766,3 et 50330,1 mg/ Kg MS, obtenues avec EMC et EAM, respectivement. La teneur la plus faible est enregistrée pour le cépage *Muscat Blanc* (23937,9 et 24131,2 mg/ Kg MS, obtenues avec EMC et EAM, respectivement).

Le résultat obtenu pour le *Muscat Blanc* est similaire au résultat obtenu par Rebello *et al.* (2013), pour la variété *Violeta* qui renferme 23944 mg/kg MS. Les teneurs en tanins condensés dans les pépins des variétés *Pinot Noir*, *Pinot Meunier* et *Chardonnay*, respectivement de :

75100, 101000, 57600 mg/Kg MF obtenues par Mané *et al.* (2007), sont nettement plus élevées que celles trouvées dans la présente étude (expression de nos résultats en MF : 3719,95-13603,18 mg/Kg MF).

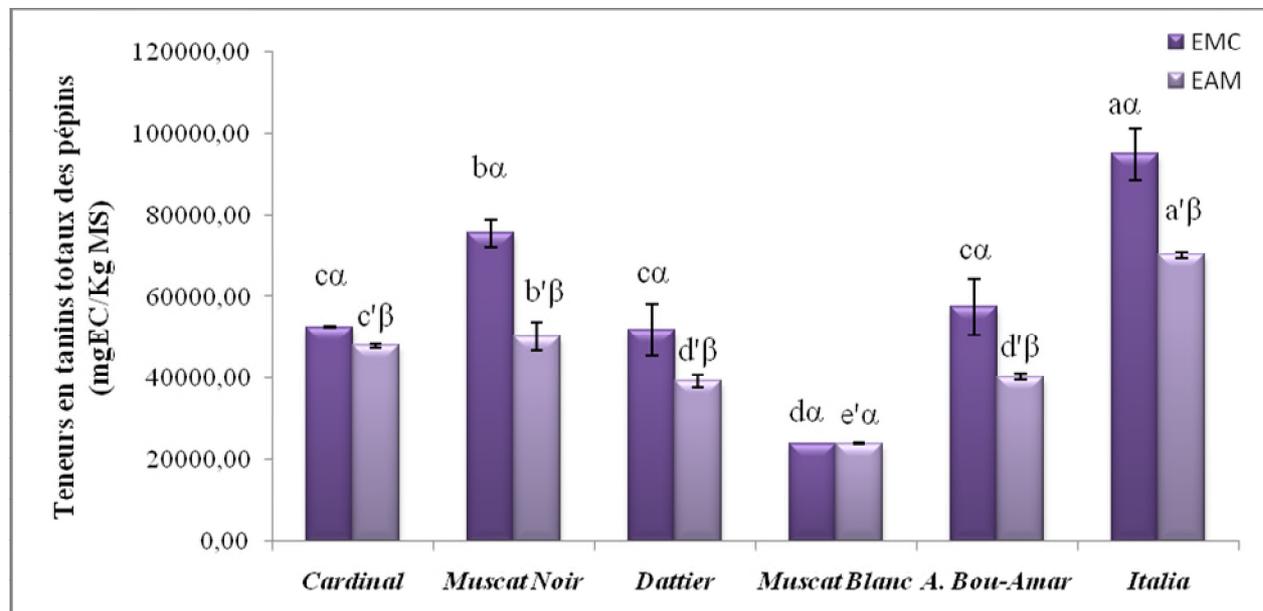


Figure 36: Teneurs en tanins totaux des pépins de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Par ailleurs, nos résultats sont supérieurs de ceux obtenus par Baiano et Terracone (2011), qui indiquent que les teneurs en tanins totaux des pépins de 7 variétés varient de 1826 (*Baresana*) à 4319 (*Pizzutello*) mg EAG/Kg MS. Aussi, Topalovic *et al.* (2012), ont retrouvé des teneurs inférieures à celles obtenues dans la présente étude : 5259,4 et 2345,4 mg/Kg MS dans les extraits des pépins du *Cardinal* et de l'*Alphonse Lavallee*, respectivement.

Les différences retrouvées entre les différentes variétés sont conséquences de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques. Selon Cadot (2008), les concentrations en tanins condensés des raisins varient considérablement, en fonction de la variété et des conditions climatiques, en particulier l'alimentation en eau et l'exposition au soleil ; une parcelle bien alimentée en eau, les pépins contiennent plus de tanins, Cependant, sur une parcelle à forte contrainte hydrique, la masse des pépins est plus faible, ils contiennent moins de tanins.

Tableau XXVI: Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pépins des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
CSE								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	6106,23± 251,36^{ca}	12529,99± 642,28^{ca}	7654,63± 1397,63^{bu}	2973,23±123,54^{ca}	6392,33 ± 191,39^{ca}	9233,01±730,28 ^{da}
2	Epicatéchine(EC)	9,01 à 9,33	4335,74 ± 36,02 ^{ca}	4361,68 ± 175,50 ^{dea}	4668,35 ± 351,57 ^{cdp}	939,82 ± 14,56 ^{fb}	2939,04±2331,61 ^{deβ}	3049,81±176,57 ^{ep}
3	Epicatéchine-O-3gallate (ECG)	11,44 à 11,98	3804,95 ± 84,63 ^{fa}	5171,11 ± 263,34 ^{da}	3702,07 ± 604,92 ^{da}	1649,21 ± 51,85 ^{ep}	2962,03±513,825 ^{dea}	4703,99±306,48 ^{ea}
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81 à 18,90	Nd	Nd	278,32 ± 192,47 ^{fb}	Nd	1009,23± 1009,23 ^{ep}	Nd
5	Catéchine-SH <i>Cis</i> (C-SH)	19,74 à 20,34	450,90± 43,45 ^{dhβ}	661,85 ± 29,83 ^{fa}	994,53 ± 78,23 ^{ca}	333,11± 11,44 ^{fb}	876,32± 176,36 ^{ca}	2532,51±318,70 ^{ea}
6	Catéchine-SH <i>Trans</i> (C-SH)	20,57 à 21,12	2413,49 ± 30,76 ^{ca}	4001,87± 160,52 ^{ca}	4957,74 ± 470,02 ^{cdca}	2014,06 ± 45,41 ^{da}	4531,85± 248,06 ^{cdca}	11585,02±972,36^{ca}
7	Epicatéchine-SH (EC-SH)	21,36 à 21,80	26544,83±399,41^{ca}	32300,25±1511,80^{ca}	23209,49±2425,27^{ca}	10439,16±69,75^{ca}	26623,49±3756,00^{ca}	42448,64±3220,25^{ca}
8	Epicatéchine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56 à 23,94	8928,94 ± 66,15^{bu}	16629,53± 523,75^{bu}	6347,93±1324,16^{bca}	5589,28±177,05^{bu}	12242,32± 305,27^{bu}	21441,28± 764,87^{bu}
EAM								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	6048,92± 675,58^{bβ}	11168,29± 405,53^{bu}	8635,18 ± 52,35^{bβ}	5307,26 ± 59,56 ^{ep}	8488,05 ± 470,92 ^{bβ}	10629,80 ± 51,57 ^{bu}
2	Epicatéchine(EC)	9,01 à 9,33	4592,51± 823,07 ^{ca}	4616,07 ± 265,79 ^{ca}	6376,99 ± 83,59 ^{ca}	1754,93± 10,30 ^{da}	6729,84 ± 311,65 ^{ca}	4417,33± 210,76 ^{ca}
3	Epicatéchine-O-3gallate (ECG)	11,44à11,98	3853,03± 246,94 ^{ca}	3484,43 ± 134,07 ^{dβ}	3031,22±147,67 ^{da}	5925,71±352,67 ^{bu}	3046,18 ± 64,94 ^{da}	4257,86 ± 215,93 ^{ca}
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81à 18,90	Nd	1451,19±10,94 ^{ca}	1182,88± 44,29 ^{efa}	Nd	1128,62 ± 197,73 ^{fa}	3814,77 ± 616,71 ^{ca}
5	Catéchine-SH <i>Cis</i> (C-SH)	19,74à 20,34	661,47 ± 96,76 ^{ca}	747,06 ± 85,73 ^{fa}	784,63± 36,66 ^{ep}	534,28 ± 40,59 ^{fa}	711,64± 33,19 ^{ca}	172,46 ± 61,58 ^{dβ}
6	Catéchine-SH <i>Trans</i> (C-SH)	20,57à 21,12	2402,73 ± 31,96 ^{da}	2968,24± 236,89 ^{dβ}	2749,14 ± 169,37 ^{dβ}	1365,88 ± 55,79 ^{ep}	2420,28±264,54 ^{deβ}	9864,50 ± 485,81 ^{bu}
7	Epicatéchine-SH (EC-SH)	21,36à 21,80	24269,51±379,71^{aβ}	20807,24±985,41^{aβ}	15300,35±1011,36^{aβ}	7917,63±102,64 ^{aβ}	15660,19±860,77 ^{aβ}	33335,37±3222,41 ^{aβ}
8	Epicatéchine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56à 23,94	6235,57±974,64^{bβ}	5087,80 ± 244,33^{ep}	1450,38 ± 183,76^{ep}	1325,54±130,75 ^{ep}	2271,85±359,50 ^{ep}	3746,86± 2394,52 ^{ep}

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : Temps de Rétention ; Nd : Non détecté.

Tableau XXVII : Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPM) des pépins des cépages étudiés.

Cépages	Méthodes d'extraction	% Dérivés Catéchine	% Dérivés Epicatéchine	% Dérivés Epicatéchine-3-O-Gallate	% EGC	DPM
<i>Cardinal</i>	EMC	17,06 ± 0,51	58,72±0,62	24,22±0,11	0	4,3±0,13
	EAM	18,94 ± 1,47	60,05±0,27	21,01±1,74	0	3,87±0,57
<i>Muscat Noir</i>	EMC	22,72±0,10	48,45±0,11	28,82±0,22	0	4,02±0,03
	EAM	29,57±0,05	50,51±0,11	17,03±0,04	2,89±0,11	2,91±0,01
<i>Dattier</i>	EMC	26,23±0,26	53,95±1,20	19,23±1,38	0,59±0,44	4,09±0,34
	EAM	30,82±0,56	54,86±0,17	11,33±0,39	0	2,46±0,07
<i>Muscat Blanc</i>	EMC	22,23±0,75	47,54±0,23	30,24±0,52	0	5,47±0,25
	EAM	29,87±0,01	40,09±0,72	30,04±0,72	0	2,02±0,03
<i>Ahmar Bou-Amar</i>	EMC	20,66±1,40	50,81±4,49	26,96±4,65	1,57±1,57	6,1±0,5
	EAM	28,74±1,04	55,34±0,16	13,14±0,44	2,78±0,42	2,46±0,24
<i>Italia</i>	EMC	24,55±0,45	47,88±0,16	27,57±0,75	0	5,99±0,05
	EAM	29,42±0,39	53,71±3,75	11,43±3,21	4,08±0,92	3,82±0,03

EMC : Extraction par Macération conventionnelle ; EAM : Extraction Assistée par Microondes.

D'après Jordão *et al.* (2001), Sun *et al.* (2001) et Barcia *et al.* (2014), l'année de la récolte et le degré de maturation affecte le contenu proanthocyanidique. Aussi, les faibles altitudes influent positivement la synthèse des proanthocyanidines en relation avec les conditions climatiques (Mateus *et al.*, 2001).

Il est à signaler que la méthode d'EAM affecte négativement et significativement la teneur totale en tanins quelle que soit la variété excepté le *Muscat Blanc* (teneurs statistiquement similaires en tanins totaux obtenues par les deux méthodes d'extraction). Les monomères de flavan-3-ols répondent différemment à la technique d'extraction. Il est remarquable que l'effet de la chaleur des microondes, sur les unités terminales et les unités d'extension, soit différent. En effet, les unités d'extension en particulier l'Epicatechine-SH, *trans*-Catéchine-SH ainsi que l'Epicatechine-3-O-Gallate-SH sont affectées négativement quelle que soit la variété en question. Une réduction importante des teneurs en Epicatechine-3-O-Gallate-SH a été observée (30-82%). Il est important de souligner que la molécule majoritaire Epicatechine-SH est considérablement affecté, quelle que soit la variété, par la chaleur engendrée par les microondes, une réduction de 9% (*Cardinal*) à 41,17 (*Ahmar Bou-Amar*) a été signalée, ce qui explique la réduction obtenue dans la teneur totale en tanins pour toutes les variétés. La concentration de la *cis*-Catéchine-SH du *Dattier* et d'*Italia* est dégradée avec des proportions de 21 et 93%, respectivement, le contraire est noté dans le cas du *Muscat Blanc*, quant aux 3 autres variétés aucune différence significative n'a été révélée. Cependant, l'Epigallocatechine est affectée positivement par les microondes une récupération meilleure est observée (76-100%).

Concernant les unités terminales, en générale, les microondes affectent positivement l'extraction de la Catéchine, de l'Epicatechine et de l'Epicatechine-3-O-gallate dans la majorité des cas et n'ont aucun effet significatif dans les autres cas, sauf la réduction observée dans la teneur en Epicatechine-3-O-gallate du *Muscat Noir* (32%). Les monomères sont aussi présents sous la même forme que les unités terminales après thiolyse, cela pourrait suggérer que les monomères seraient mieux extraits par les micro-ondes, diminuant de fait ensuite la concentration des unités -SH issues, elles, de la dépolymérisation des polymères.

III.3. Tanins des pulpes

Les résultats obtenus indiquent que le profil quantitatif et qualitatif des tanins condensés dépend de la variété et de la méthode d'extraction utilisée. La figure 37 illustre les chromatogrammes représentatifs enregistrés à 280 nm des extraits de la pulpe.

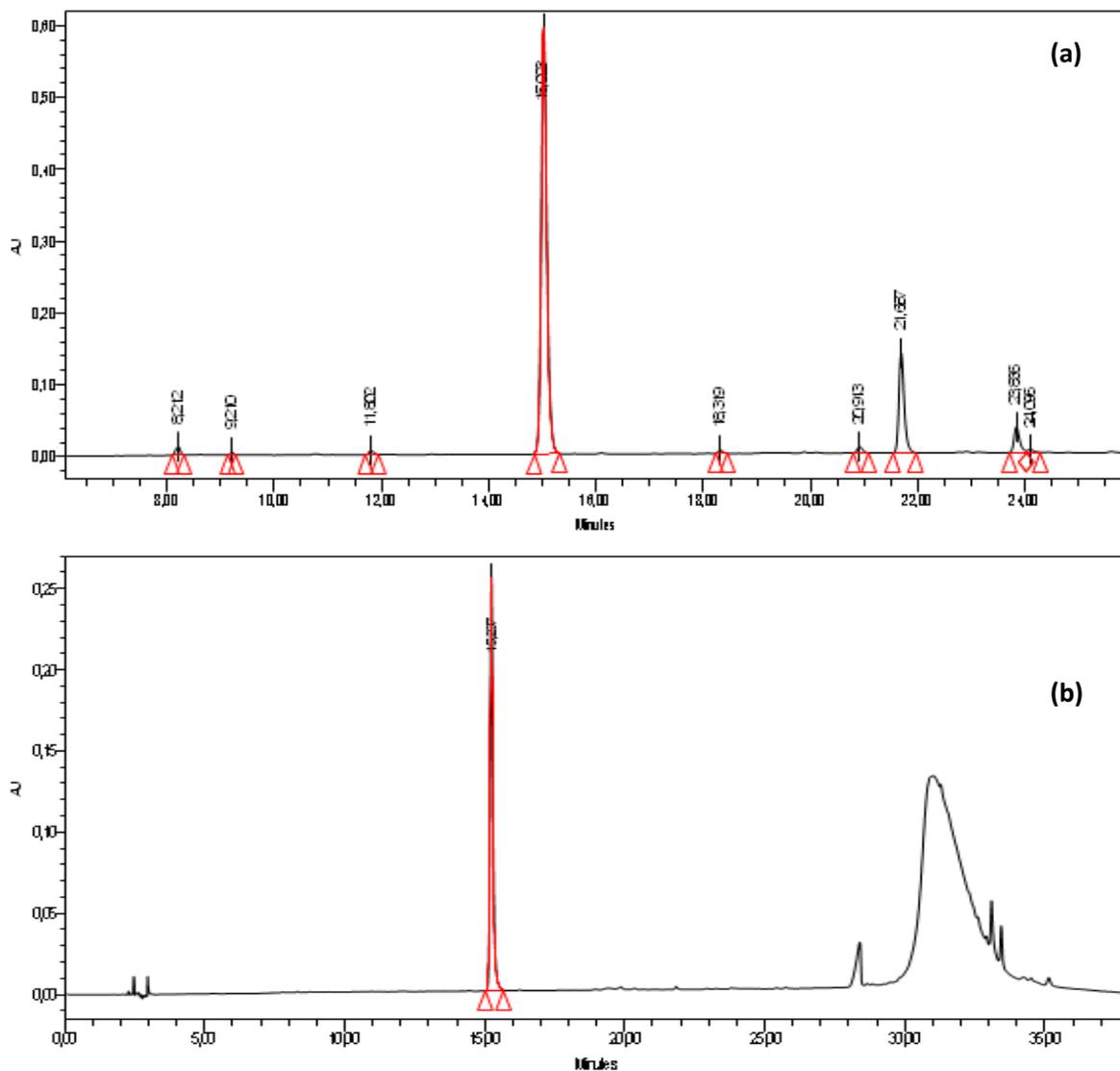


Figure 37 : Chromatogrammes obtenus à 280 nm pour les extraits de la pulpe du cépage *Italia* obtenus par EAM (a) et EMC (b).

La figure 38 présente les teneurs en tanins totaux pour chaque extrait obtenu avec les deux méthodes d'extraction étudiées.

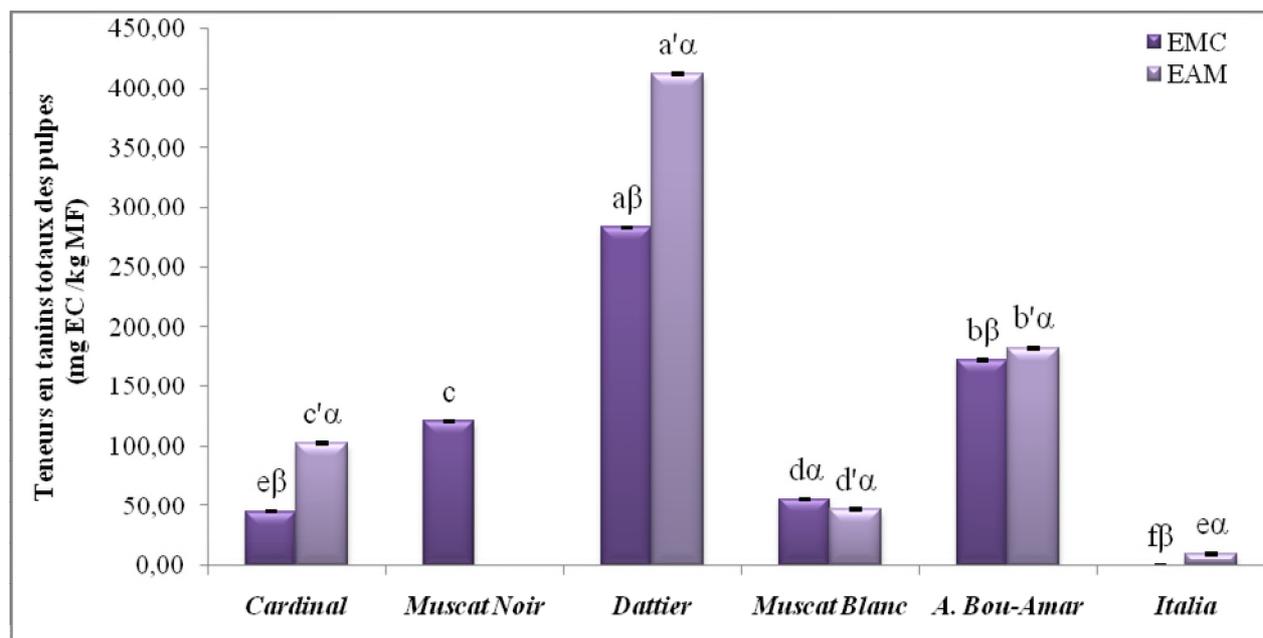


Figure 38 : Teneurs en tanins totaux des pulpes de raisins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse statistique indique que la variété *Dattier* renferme une quantité non négligeable en tanins totaux (283,12 et 411,97 mg/kg MF, obtenues avec EMC et EAM, respectivement), suivie par la variété *Ahmar Bou-Amar* (171,90 et 182,32 mg/kg MF, obtenues avec EMC et EAM, respectivement), puis par le *Muscat Noir* (120,41 mg/kg MF) et le *Cardinal* (46,35-102,66 mg/kg MF, obtenues avec EMC et EAM, respectivement). En outre, de faibles concentrations en tanins totaux sont enregistrées dans les extraits du *Muscat Blanc* (30,45 et 47,26 mg/kg MF, obtenues avec EMC et EAM, respectivement) et d'*Italia* (9,91 mg/kg MF). Mané *et al.* (2007), ont enregistré des teneurs en tanins totaux dans la pulpe de 260 (*Pinot Meunier*), 360 (*Chardonnay*) et 450 (*Pinot Noir*) mg/Kg MF.

De même, Nile *et al.* (2013), ont obtenu des teneurs de 201,1 (*Italia*)- 471,0 (*Ontario*) mg/Kg MF. Ces résultats sont relativement proches de ceux obtenus dans la présente étude. Aussi, Topalović et Mikulić-Petkosek (2010), ont noté une teneur de 8,85 mg/kg MF dans la pulpe du cépage *Cardinal*, ce résultats est proche de celui obtenu pour le cépage *Italia* mais inférieur de celui obtenu pour le *Cardinal* étudié dans le présent travail.

Les teneurs en monomères flavan-3-ols, constituant les proanthocyanidines, des différentes variétés sont récapitulées dans le tableau XXVIII.

Le composé le plus abondant est l'Epicatechine-SH qui représente 37% (*Dattier*) à 67 % (*Ahmar Bou-Amar*) de la teneur total en tanins. Dans le cas de la variété *Italia*, ce composé vient en deuxième position, avec un taux significativement similaire avec la Catéchine (12%), puis la *trans*-catéchine qui représente 67% de la teneur totale en tanins. L'ordre des autres composés dépend du cépage. Topalović et Mikulić-Petkosek (2010), ont indiqué que l'Epicatechine est l'unité prédominante des tanins dans la pulpe de raisin variété *Cardinal*. La proportion des dérivés de Catéchine et d'Epicatechine, le degré de galloylation (% ECG) ainsi que le degré moyen de polymérisation (DPM) sont regroupés dans le tableau XXIX la proportion en ECG varie de 4,42 à 18,08% (selon les cultivars et la méthode d'extraction), le degré de galloylation (% ECG) est de 0-30%, quant au DPM varie de 4,00 -9,28. Selon Mané *et al.* (2007), les valeurs notées pour le DPM, % de galloylation ainsi que % ECG, dans les extraits de la pulpe de 3 variétés de raisin, varient respectivement de 18,00 à 21,00, de 3,2 à 5,21 et enfin de 4,3 à 7,0.

La technique d'extraction influence considérablement la teneur totale en tanins de la pulpe de raisin. En effet, la technique d'EAM est plus efficace pour l'extraction des tanins totaux à partir de la pulpe des cépages *Italia*, *Cardinal* et *Dattier*, elle permet d'extraire des teneurs de 100%, 45% et 44%, respectivement, plus importante que l'extraction conventionnelle. Quant aux variétés *Muscat blanc* et *Ahmar Bou-Amar* aucune différence significative n'a été révélée. Comme déjà été signalé, dans le cas des pépins et de la pellicule, les composés individuels des monomères de flavan-3-ols réagissent différemment à la technique d'extraction.

Dans le cas de la pulpe, des variations marginales ont été observées entre les cépages. En effet, l'effet des microondes sur la Catéchine et l'Epicatechine n'est significatif dans le cas des cépages *Cardinal*, *Dattier* et *Muscat Blanc*, un effet positif est signalé dans le cas d'*Italia* (récupération à 100% par cette technique d'extraction) et un effet négatif dans le cas d'*Ahmar Bou-Amar* (réduction de 16 et 20% des teneurs en catéchine et en épicatechine, respectivement). L'unité spécifique de la pellicule « Epigallocatechine » est généralement non affecté par la méthode d'extraction, sauf dans le cas du *Cardinal* et d'*Italia* qui est récupérée à 100% par cette méthode.

Tableau XXVIII: Les flavan-3-Ols détectés dans les extraits de pulpes des raisins étudiés (mg EC/Kg MS).

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
<u>EMC</u>								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	7,13±0,57 ^{ba}	19,93±2,91 ^b	25,89±10,95 ^{bcβ}	1,61±1,60 ^{ca}	15,01±0,46 ^{ba}	nd
2	Epicatechine(EC)	9,01 à 9,33	Nd	4,15±0,96 ^{cd}	8,43±2,52 ^{ca}	1,96±1,95 ^{ca}	4,47±0,33 ^{cβ}	nd
3	Epicatechine-O-3gallate (ECG)	11,44 à 11,98	nd	6,14±0,97 ^c	8,32±1,94 ^{ca}	0,54±0,53 ^{ca}	4,52±0,57 ^{ca}	nd
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81 à 18,90	nd	nd	85,39±85,39 ^{abα}	21,11±8,08 ^{αα}	12,56±5,38 ^{ba}	nd
5	Catéchine-SH <i>Cis</i> (C-SH)	19,74 à 20,34	nd	6,47±2,42 ^c	8,06±8,06 ^{ca}	11,95±6,06 ^{bβ}	5,18±1,66 ^{cβ}	nd
6	Catéchine-SH <i>Trans</i> (C-SH)	20,57 à 21,12	5,95±0,19 ^{ca}	3,52±0,50 ^d	110,59±58,83^{αα}	10,38±4,49 ^{ba}	6,6±0,29 ^{ca}	nd
7	Epicatechine-SH (EC-SH)	21,36 à 21,80	26,9±0,81^{aβ}	64,74±7,99^a	25,67±9,55 ^{bcβ}	6,24±2,60 ^{bcα}	109,17±4,88^{αα}	nd
8	Epicatechine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56 à 23,94	5,37±0,39 ^{ca}	15,45±0,67 ^b	10,78±00 ^{ca}	2±0,47 ^{ca}	14,4±0,45 ^{bβ}	nd

Suite du tableau XXVIII :

Pic	Composés	TR (min)	Cardinal	Muscat Noir	Dattier	Muscat Blanc	A. Bou-Amar	Italia
<u>EAM</u>								
1	Catéchine (C)	7,98 à 8,33	8±2,62 ^{ba}		38,77±7,05 ^{bca}	5,43±1,93 ^{ba}	12,55±0,24 ^{bca}	0,87±0,31 ^{bca}
2	Epicatechine(EC)	9,01 à 9,33	2,03±0,38 ^{ba}		12,16±2,12 ^{ca}	1,67±1,67 ^{ba}	3,54±0,23 ^{dea}	0,19±0,08 ^{ca}
3	Epicatechine-O-3gallate (ECG)	11,44 à 11,98	1,74±0,04 ^{ba}		12,3±2,34 ^{ca}	1,55±0,43 ^{ba}	4,51±0,47 ^{cdea}	0,09±0,02 ^{ca}
4	Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18,81 à 18,90	9,27±0,04 ^{ba}		32,97±2,20 ^{bca}	11,85±11,85 ^{aba}	10,59±2,00 ^{bcdα}	0,43±0,08 ^{cdα}
5	Catéchine-SH <i>Cis</i> (C-SH)	19,74 à 20,34	1,98±1,97 ^{ba}		84,85±58,86 ^{ba}	2,16±0,27 ^{ba}	1,28±0,11 ^{ea}	0,33±0,03 ^{cdα}
6	Catéchine-SH <i>Trans</i> (C-SH)	20,57 à 21,12	2,68±0,83 ^{bβ}		10,38±7,36 ^{cβ}	3,59±3,59 ^{ba}	8,42±0,29 ^{bcdeβ}	6,35±0,76^{aa}
7	Epicatechine-SH (EC-SH)	21,36 à 21,80	71,03±19,28^{aa}		204,83±61,11^{aa}	19,57±17,68^{aa}	125,59±13,71^{aa}	1,16±0,30 ^{ba}
8	Epicatechine-3-O-Gallate-SH (ECG-SH)	23,56 à 23,94	5,92±0,51 ^{ba}		15,71±8,25 ^{ca}	1,45±0,65 ^{ba}	15,85±0,53 ^{ba}	0,49±0,13 ^{cd}

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Nd : Non détecté. TR : Temps de Rétention.

Tableau XXIX: Proportions de différentes fractions de tanins, degré de galloylation, et le degré de polymérisation moyen (DPm) des pulpes des cépages étudiés.

	Méthode d'extraction	% Dérivés Catéchine	% Dérivés Epicatéchine	% Dérivés Epicatéchine-3-O-Gallate (% ECG)	% EGC	DPm
<i>Cardinal</i>	EMC	28,83 ± 0,33	59,32 ± 0,74	11,86 ± 1,07	0	6,4 ± 0,4
	EAM	12,12 ± 0,95	70,42 ± 3,37	7,97 ± 2,24	9,5 ± 2,08	8,8 ± 0,32
<i>Muscat Noir</i>	EMC	24,65 ± 1,48	57,27 ± 0,38	18,08 ± 1,10	0	4,00 ± 0,1
	EAM	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Dattier</i>	EMC	51,5 ± 22,82	12,13 ± 4,50	6,79 ± 2,23	29,57 ± 29,57	7,7 ± 2,92
	EAM	32,46 ± 17,67	52,72 ± 14,50	6,81 ± 2,59	8,01 ± 0,56	6,59 ± 0,69
<i>Muscat Blanc</i>	EMC	44,58 ± 19,81	14,11 ± 6,99	4,42 ± 1,43	36,89 ± 11,37	7,39 ± 0,01
	EAM	24,05 ± 4,90	42,46 ± 30,41	6,19 ± 1,78	27,3 ± 27,29	5,46 ± 0,01
<i>Ahmar Bou-Amar</i>	EMC	15,56 ± 0,28	66,26 ± 2,16	11,06 ± 0,73	7,11 ± 2,61	7,15 ± 0,31
	EAM	12,29 ± 1,04	70,67 ± 1,88	11,29 ± 1,47	5,76 ± 0,63	8,88 ± 0,93
<i>Italia</i>	EMC	nd	nd	nd	nd	0
	EAM	75,85 ± 6,01	13,78 ± 3,10	5,94 ± 1,84	4,42 ± 1,06	9,38 ± 2,5

EMC : Extraction par Macération conventionnelle ; *EAM* : Extraction Assistée par Microondes.

La même remarque est soulevée pour l'Epicatechine-3-O-gallate. L'Epicatechine-SH, la molécule la plus abondante des tanins de la pulpe de la majorité des variétés, est mieux récupérée par la technique d'EAM avec des taux allant de 62 (*Cardinal*) à 100% (*Italia*), excepté *Muscat Blanc* et *Ahmar Bou-Amar* qui ne présente aucune différence significative. Par contre, la *trans*-Catéchine est remarquablement dégradée sous l'effet de la chaleur des microondes, sauf dans le cas de la variété *Italia*. Il est important de souligner, que la plupart des molécules sont détectées dans les extraits obtenus par les microondes et non détectés dans les autres extraits correspondants. A titre d'exemple seules 3 molécules sont détectées dans le cas du *Cardinal* et aucune dans le cas de *Italia* sous l'effet des microondes (fig. 37).

III.4. Comparaison de l'effet des deux méthodes d'extraction sur les tanins des différentes matrices étudiées (pépins, pellicule et la pulpe).

Il est important d'attribuer une attention particulière à l'Epicatechine-3-O-gallate-SH, unité importante dans les polymères des pépins comparativement à ceux des pellicules et des pulpes. Comme nous l'avons signalé auparavant, cette unité est dégradée par les microondes dans les extraits des pépins et de pellicules quelle que soit la variété. Comme cette molécule se trouve en faible quantité dans la pellicule, cela n'a pas affecté la teneur totale en tanins et les composés phénoliques. Cependant dans le cas des pépins cette molécule est présente en quantité importante (environ 20%) ce qui affecte considérablement la teneur totale en tanins des pépins. Cela peut expliquer les teneurs inférieures en tanins et en composés phénoliques totaux enregistrées dans les extraits obtenus par la technique d'EAM en comparaison à la technique conventionnelle. Par ailleurs, la teneur en Epicatechine-SH, la molécule majoritaire des tanins de toutes les matrices, est réduite dans le cas des pépins, un effet non significatif dans le cas des pellicules et positif dans le cas des pulpes, cela peut aussi expliquer la réduction de la teneur totale des pépins en appliquant les microondes.

Une même molécule devrait répondre de la même manière pour toutes les matrices, cependant d'une matrice à une autre, la structure des proanthocyanidines n'est pas identique. En effet, les tanins des pellicules et des pulpes se distinguent de ceux des pépins par une plus faible teneur en dérivés galloylés (% ECG ou % galloylation), un DPM élevé et la présence de dérivés de prodephinidines (EGC). Par conséquent, les molécules de tanins des pellicules sont plus grosses et plus complexes. Il est probable que plus le polymère est grand plus la résistance aux microondes est meilleure ; plus la taille du polymère est petite plus les molécules sont sous forme monomérique donc sont plus exposées et plus est grande la dégradation. Aussi, les dérivés de prodephinidines (EGC) qui sont présents en quantité importante dans les pellicules et les pulpes et pratiquement absents dans les pépins sont mieux

extraits par EAM, d'une manière globale la teneur totale en tanins dépend de la réponse des composés dominants à telle ou telle méthode d'extraction.

D'autre part, la teneur élevée en eau dans la pulpe utilisée dans son état frais ainsi que la présence d'oxygène favorisent les réactions d'oxydation des composés phénoliques. Lors des manipulations, nous avons remarqué que les pulpes brunissent rapidement, particulièrement celle de la variété *Italia*. Le brunissement observé est sans doute lié à l'oxydation enzymatique de composés phénoliques, ce qui aboutit à la formation des *o*-quinones, qui sont rapidement polymérisés en produits bruns. En étudiant particulièrement les tanins des pulpes avec les deux méthodes d'extraction, et en reliant les valeurs mesurées à ces observations ci-dessus, nous pouvons dire que le long temps d'extraction utilisé lors de l'extraction conventionnelle a favorisé l'oxydation des tanins, principalement ceux de la variété *Italia*, expliquant ainsi qu'aucune molécule n'a été détectée. Par contre, l'extraction assistée par microondes, qui nécessite un temps d'extraction de l'ordre de quelques secondes, ne réduit pas d'une manière notable ces composés.

VI. Anthocyanes

Les anthocyanes sont produites seulement dans la pellicule des trois raisins rouges étudiés : *Cardinal*, *Muscat Noir* et *Ahmar Bou-Amar*. Le profil chromatographique des anthocyanes est illustré dans la figure 39.

Les composés individuels identifiés, leurs concentrations exprimées en mg EMv3G/Kg de MS ainsi que les temps de rétention correspondant pour chaque composé sont présentés dans le tableau XXX. Treize anthocyanes sont détectées dans la pellicule des cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* et seulement une seule dans celle du cépage *Ahmar Bou-Amar* (fig. 35b). Cependant, deux anthocyanes n'ont pas pu être identifiées, les anthocyanes aux pics détectés aux temps de rétention de 24,38 à 24,85 et de 24,42 à 25,22 min. L'identification des anthocyanes a été entièrement basée sur les données spectrales et les temps de rétentions qui correspondent à celles des molécules standards (étalons).

Le profil quantitatif des anthocyanes varie selon les cultivars et l'analyse statistique indique clairement que le *Cardinal* est le cépage le plus riche en anthocyanes avec des teneurs moyennes totales de 3227,24 mg/kg MS. Le cépage *Muscat Noir* vient en deuxième position avec une teneur moyenne totale en anthocyanes de 1705,22 mg/kg MS. *Ahmar Bou-Amar* renferme la teneur la plus faible (272,71 mg/kg MS). Les résultats obtenus pour les cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* appartiennent à l'intervalle obtenu par Costa *et al.* (2014), qui ont identifié 12 anthocyanes dans la

pellicule de 24 variétés de raisins portugais dont les teneurs en anthocyanes totales varient de 1110 (*Bastardo*) et 11470 mg Mv3G/Kg MS (*Monvedro*), et à ceux obtenus par Ramirez-Lopez *et al.* (2014), qui ont enregistré des teneurs de 1559,42 et 22703,85 mg/Kg MS dans les extraits acétonique 50% et méthanolique 70% des marcs de raisin de la variété *Cynthiana*. De même, la concentration enregistrée pour la variété *Cardinal* appartient à l'intervalle obtenu par Perestrelo *et al.* (2012), qui varie de 2199,7 à 8352,2 mg EMv3G/Kg MS ; concentrations enregistrées dans les extraits des pellicules des cépages *Sercial* et *Tinta Negra*, respectivement.

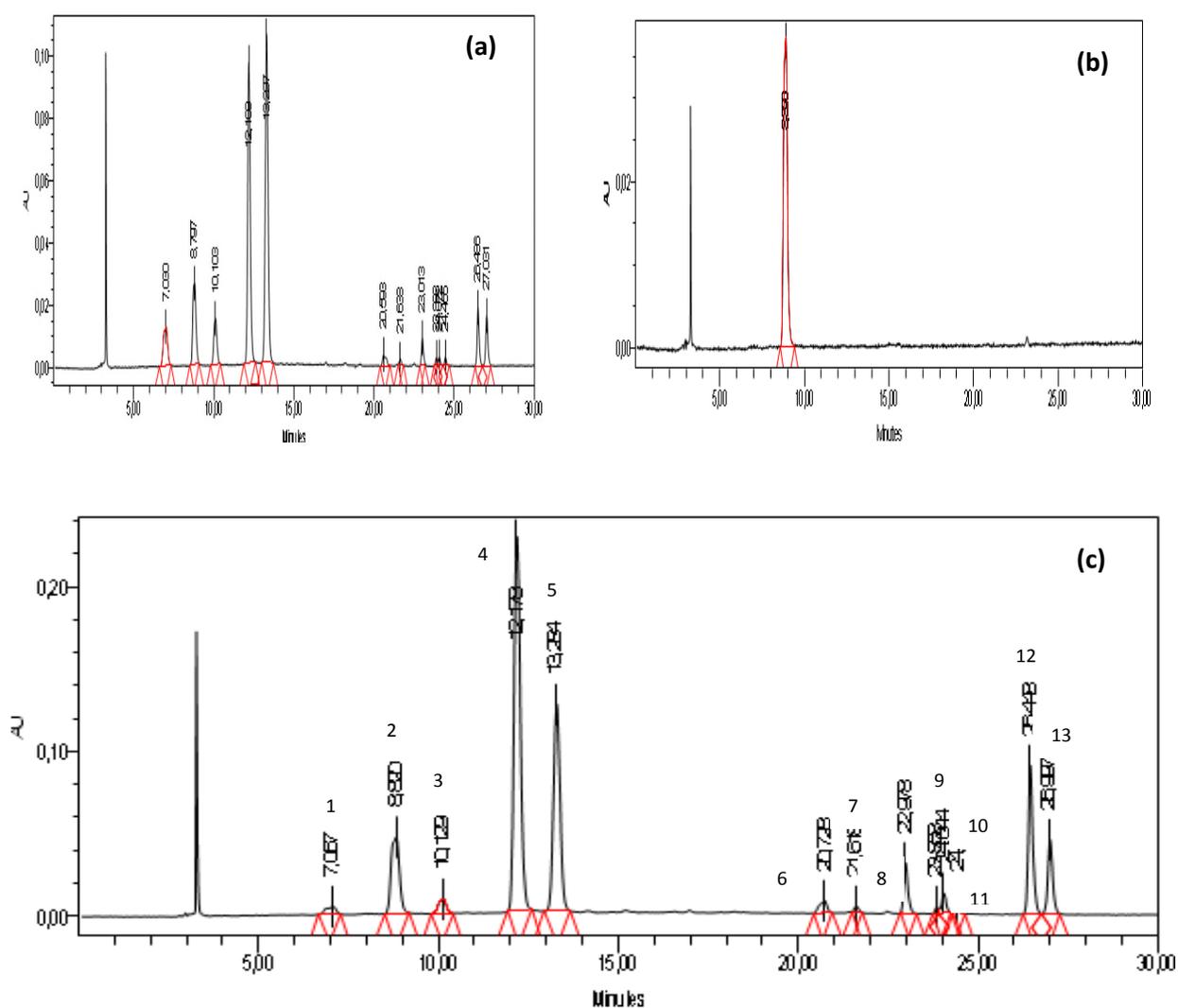


Figure 39 : Chromatogrammes obtenus à 520 nm pour les extraits anthocyaniques des cépages *Muscat Noir* (a), *Ahmar Bou-Amar* (b) et *Cardinal* (c).

Dans leur étude sur l'effet du séchage de la pellicule de la variété *Violeta* sur les différentes classes phénoliques, Barcia *et al.* (2014), ont obtenu une teneur en anthocyanes totales de 3,2 et 57,7 mg/Kg MS respectivement dans des échantillons séchés dans une étuve à 50°C et déshydratés par la lyophilisation, ces résultats sont largement inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude. Cependant les résultats obtenus par Baiano et Terracone (2011), qui ont enregistré des teneurs en anthocyanes totales de 8300, 10100 et 13300 mg EAG/Kg MS dans les extraits de pellicules des cépages *Crimson Seedless*, *Red Globe* et *Michele Palieri*, respectivement, sont largement supérieurs.

D'après la description présentée ci-dessus, les anthocyanes pourraient être considérées comme des marqueurs utiles pour distinguer les variétés de raisin, bien que cette caractéristique doit être utilisée avec prudence, car la teneur en anthocyanes est fortement influencée non seulement par des facteurs agronomiques tels que la composition du sol, l'irrigation, l'intensité lumineuse, etc., mais aussi par les conditions climatiques de l'année (Adams, 2005 ; Cadot, 2006 ; Guerrero *et al.* 2009). Les différences retrouvés entre les différents résultats sont probablement dues à l'effet variétal, à la différence entre les standards utilisés pour exprimer les résultats (acide gallique par ces auteurs et Mv3G dans notre cas), à l'origine géographique et climatique.

D'après Mateus *et al.* (2001), les hautes altitudes semblent être favorables pour la synthèse des concentrations importantes en anthocyanes en relation avec les conditions climatiques. Le profil qualitatif des anthocyanes des cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* est pratiquement identique, cinq différentes anthocyanes glycosylées sont détectées dans les deux extraits en pics 1, 2, 3, 4 et 5 qui sont respectivement : Delphinidine-3-Glucoside; Cyanidine-3-Glucoside; Pétunidine-3-Glucoside; Péonidine-3-Glucoside et Malvidine-3-Glucoside, dont certaines d'entre elles se sont reproduites dans plusieurs schémas de glycosylation en pics 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 (tableau XXX).

Les anthocyanes les plus abondantes dans la pellicule des cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* sont respectivement, en première position la Péonidine-3-glucoside (40%) et la Malvidine-3-glucoside (33%) et en deuxième position la Malvidine-3-glucoside (22%) et la Péonidine-3-glucoside (30%). Quant au cépage *Ahmar Bou-Amar*, il n'est composé que de la cyanidine-3-glucoside (100%). Les dérivés totaux de la Delphinidine et de la Pétunidine ne représentent que 3% et 2%, respectivement dans la teneur totale des anthocyanes du *Cardinal* et 8 et 6% dans le cas de la variété *Muscat Noir*. Les dérivés totaux de la Cyanidine occupent 14 et 12% de la concentration en anthocyanes totales des cépages *Cardinal* et *Muscat Noir*, respectivement (tableau XXXI).

Tableau XXX: Les anthocyanes détectées dans les extraits des pellicules des raisins rouges étudiés (mg EMv3G/Kg MS).

Pic	Composés identifiés	TR (min)	<i>Cardinal</i>		<i>Muscat Noir</i>		<i>Ahmar Bou-Amar</i>	
			EMC	EAM	EMC	EAM	EMC	EAM
1	Delphinidine-3G (Dp3)	7,02 à 8,04	38,89 ± 0,02	30,09 ± 1,16	105,73 ± 0,85	75,80 ± 0,80	Nd	Nd
2	Cyanidine-3G (Cy3G)	8,77 à 9,85	340,00 ± 1,63d	232,85 ± 7,02	170,50 ± 1,89	117,42 ± 2,67	272,71 ± 2,54	187,72 ± 1,72
3	Pétunidine-3G (Pt3G)	10,09 à 11,22	58,19 ± 2,00	44,83 ± 2,52	94,21 ± 0,12	65,00 ± 0,40	Nd	Nd
4	Péonidine-3G (Pn3G)	12,17 à 13,25	1263,85 ± 4,37a	893,12 ± 27,36	502,36 ± 2,81	350,79 ± 2,18	Nd	Nd
5	Malvidine-3G (Mv3G)	13,28 à 14,35	726,85 ± 3,58b	52,86 ± 15,78	581,99 ± 5,99	394,88 ± 3,55	Nd	Nd
6	Dp3G Coum	20,73 à 21,62	46,58 ± 4,46	31,15 ± 1,98	25,98 ± 0,86	17,00 ± 1,34	Nd	Nd
7	Pn3G acylée	21,61 à 22,49	12,11 ± 1,33	12,60 ± 1,50	9,25 ± 1,77	4,73 ± 0,79	Nd	Nd
8	Cy3G coum	22,97 à 23,91	111,71 ± 3,91f	87,41 ± 4,81	35,76 ± 2,06	29,38 ± 0,82	Nd	Nd
9	Pt3G coum	23,85 à 24,79	11,99 ± 0,33	11,37 ± 1,36	10,57 ± 1,53	6,97 ± 0,86	Nd	Nd
10	Antho1	24,38 à 24,85	39,59 ± 5,71	16,89 ± 0,41	10,34 ± 0,19	3,62 ± 0,92	Nd	Nd
11	Antho2	24,42 à 25,22	21,68 ± 2,21	7,85 ± 0,82	9,59 ± 1,15	3,80 ± 0,11	Nd	Nd
12	Pn3G coum	26,43 à 27,26	364,14 ± 0,75c	267,08 ± 9,28	74,59 ± 0,13	57,16 ± 0,72	Nd	Nd
13	Mv3G coum	26,98 à 27,80	191,66 ± 0,15e	143,35 ± 2,58	66,91 ± 0,65	51,07 ± 1,49	Nd	Nd
Anthocyanes totales			3227,24±25,65	2281,43±74,61	1700,77±4,45	1177,61±2,29	272,71± 2,54	187,72±1,72

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$. $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. TR : Temps de Rétention ; Coum : coumaroylés ; Antho : Anthocyanes ; Nd : Non détecté.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Benmeziane *et al.* (2016), qui ont montré que les dérivés de la Péonidine et de la Malvidine sont les dominants, respectivement dans les variétés *Cardinal* et *Muscat Noir* cultivés en Algérie (El-Taref).

De même, nos résultats sont similaires à ceux notés par Rolle *et al.* (2015) dans une étude menée sur le cépage *Muscat de Hambourg* (*Muscat Noir*) en étudiant l'effet du diamètre de la baie, qui ont observé que les dérivés de la Malvidine (40-41%) sont les prédominants suivis par les dérivés de la Péonidine (30-35%). Selon Baiano et Terracone (2011), l'anthocyane dominante du cépage *Michele Palieri* est la Malvidine-3-G, quant à celle des cépages *Crimson Seedless* et *Red Globe* est la Péonidine-3-G. Guerrero *et al.* (2009), ont observé que la Malvidine-3-glucoside représente de 30 à 50% de la teneur totale des anthocyanes, selon les cultivars.

Les mêmes constatations ont été notées par Costa *et al.* (2014), la Malvidine-3-glucoside est l'anthocyane majoritaire de 12 variétés, elle représente 53 et 56% de la concentration totale des cépages *Bastardo* et *Monvedro*, respectivement et par Dallas et Laureano (1994).

Les anthocyanes non-acylées sont la principale classe des anthocyanes des raisins étudiés, elle représente 100%, 85% et 75% des anthocyanes totales des cépages *Ahmar Bou-Amar*, *Muscat Noir* et *Cardinal*, respectivement. Les dérivés acylés (acétylés et coumaroylés), sont plus présents dans la variété *Cardinal* (25%), puis dans la variété *Muscat Noir* (15%) et sont absents dans la variété *Ahmar Bou-Amar* (0%), ce qui explique sa couleur rose. D'après Mizuno et Okamoto (2006) et Costa *et al.* (2014), l'acylation est considérée comme un des facteurs importants conduisant à l'augmentation de l'intensité de la coloration des pellicules des baies de raisin. Les dérivés coumaroylés sont les plus importants des anthocyanes acylés 95% et 98% pour les variétés *Muscat Noir* et *Cardinal*, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Rolle *et al.* (2015), 93-95% sont des anthocyanes identifiées sont des non-acylées, ainsi les anthocyanes acylées ne représentent que 5-7% dont les prédominantes d'entre elles sont les coumaroylées avec un pourcentage de 86%. Aussi, Castillo-Munoz *et al.* (2009) dans leur étude sur la variété *Garnacha Tintorera*, ont soulevé les mêmes remarques.

Selon les résultats obtenus par Costa *et al.* (2014), les anthocyanes non-acylées représentent 61 à 81% de la concentration totale en anthocyanes et les anthocyanes coumaroylées sont classées en deuxième position, le groupe minoritaire est celui des anthocyanes acétylées.

Tableau XXXI: Proportions des différentes fractions d'anthocyanes détectées dans les pellicules des raisins rouges étudiés (%).

	<i>Cardinal</i>		<i>Muscat Noir</i>		<i>Ahmar Bou-Amar</i>	
	EMC	EAM	EMC	EAM	EMC	EAM
% Delphinidine	2,65 ± 0,12 ^g	2,68 ± 0,05 ^g	7,74 ± 0,08 ^g	7,88 ± 0,20 ^f	00 ± 00	00 ± 00
% Cyanidine	14,00 ± 0,04 ^f	14,03 ± 0,06 ^f	12,13 ± 0,24 ^e	12,47 ± 0,27 ^e	100^a	100^a
% Pétunidine	2,17 ± 0,05 ^h	2,46 ± 0,07 ^h	6,16 ± 0,11 ^h	6,11 ± 0,09 ^g	00 ± 00	00 ± 00
% Péonidine	39,54 ± 0,14^b	39,70 ± 0,03^b	30,08 ± 0,02 ^c	30,19 ± 0,19 ^c	00 ± 00	00 ± 00
% Malvidine	28,46 ± 0,11 ^c	28,33 ± 0,12 ^c	38,33 ± 0,29^b	37,87 ± 0,50^b	00 ± 00	00 ± 00
% Antho-Acylées	0,37 ± 0,04 ⁱ	0,55 ± 0,05 ⁱ	0,54 ± 0,11 ⁱ	0,40 ± 0,07 ^h	00 ± 00	00 ± 00
% Antho-Coum.	21,06 ± 0,05 ^e	22,32 ± 0,05 ^e	11,22 ± 0,19 ^f	12,28 ± 0,05 ^e	00 ± 00	00 ± 00
% Acylées-Coum.	24,77 ± 0,34 ^d	25,32 ± 0,08 ^d	14,46 ± 0,25 ^d	14,75 ± 0,09 ^d	00 ± 00	00 ± 00
% Non-Acylées	75,23 ± 0,34^a	74,68 ± 0,08^a	85,53 ± 0,25^a	85,25 ± 0,09^a	100 ± 00	100 ± 00

Les valeurs portant des lettres différentes dans la même colonne et pour la même méthode d'extraction sont significativement différentes ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$; Coum : coumaroylés ; Nd : Non détecté.

Il a été rapporté qu'une concentration élevée en dérivés d'anthocyanines *p*-coumaroylés, principalement la Malvidine et la Pétunidine, est associée à des climats chauds (Downey *et al.*, 2006). Toutefois, selon Fernández-Lopez *et al.* (1998), la composition en anthocyanes est étroitement liée à son patrimoine génétique et, d'un point de vue qualitatif, est tout à fait indépendante des conditions saisonnières ou de la zone de production. Les proportions entre les différentes anthocyanes sont une caractéristique variétale et peuvent être utilisées comme base de classification taxonomique (Roggero *et al.* 1988).

La méthode d'extraction influence considérablement le profil quantitatif individuel et total des anthocyanes. La chaleur engendrée par les microondes dégrade nettement toutes les molécules quelle que soit la variété en question. Une réduction en teneur totale est de l'ordre de 31% pour toutes les variétés.

Les résultats indiquent que toutes les anthocyanes glycosilées et coumaroylées sont sensibles aux hautes températures. Cependant, l'anthocyane acétylée détectée dans la pellicule du *Cardinal* s'avère plus résistante à la température. Expérimentalement, nous avons remarqué un changement de couleur, un brunissement des extraits est obtenu par EAM (du rouge vif en rouge brun).

Ces résultats sont en agrément avec les constatations de Ju et Howard (2003), qui montrent que l'extraction à des hautes températures (> 60°C), entraîne la destruction des anthocyanes des pellicules de raisin. De même, Oancea *et al.* (2012) ont rapporté qu'une extraction à des températures supérieures à 70°C induit une dégradation rapide des anthocyanes et la formation des produits bruns en présence d'oxygène dont le mécanisme est présenté dans la figure 40. D'autre part, Liazid *et al.* (2014) ont montré que l'extraction par microondes cause la dégradation des anthocyanes des pellicules de raisin en comparaison à l'extraction liquide à basse pression à 125°C, et que les anthocyanes acylées sont plus résistantes à la température que les anthocyanes glycosilées.

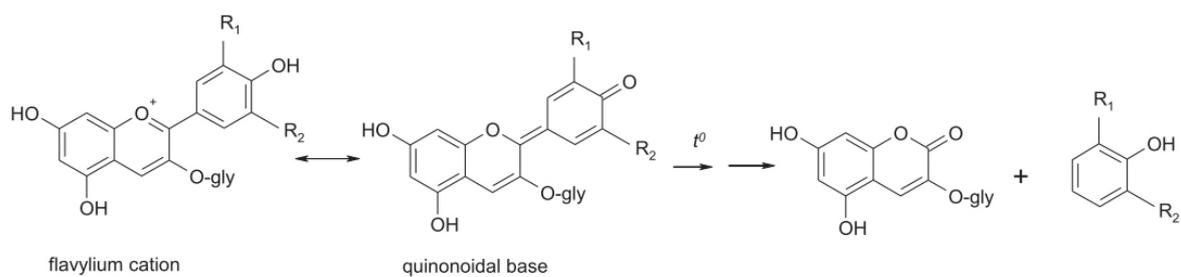


Figure 40: Dégradation d'une anthocyane monoglycoside par la chaleur (Oancea *et al.*, 2012).

Chapitre V
Activité antioxydante

Chapitre V : Activité antioxydante

La complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants ne permet pas d'établir une méthode conventionnelle pour mesurer l'activité antioxydante. Généralement, une combinaison de différents tests est menée pour avoir une indication sur la capacité antioxydante d'une matrice végétale (Lutz *et al.*, 2011 ; Costa *et al.*, 2014).

Plusieurs tests évaluant l'activité antioxydante sont rapportés par la littérature. Dans le présent travail, trois méthodes ont été réalisées pour estimer la capacité antioxydante des échantillons étudiés à savoir : le pouvoir réducteur du fer, l'activité antiradicalaire (DPPH[•] et ABTS^{•+}) et le pouvoir de chélation du fer.

I. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur est la capacité qu'a un extrait à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (Huang *et al.*, 2005 ; Bourgoou *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009).

I.1. Pouvoir réducteur des pépins

Le pouvoir réducteur du fer des pépins des raisins étudiés est illustré dans la figure 41. Tous les échantillons présentent la capacité de céder un électron et de réduire ainsi le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺).

Le pouvoir réducteur des pépins varie de 130,74 mg EAA/g (*Muscat Blanc*) à 211,74 mg EAA/g MS (*Italia*) dans le cas des extraits obtenus par EMC. L'analyse statistique montre des différences significatives ($p < 0,05$) entre le pouvoir réducteur du fer des pépins des différents cépages, sauf pour le *Dattier* et le *Cardinal* qui présentent des capacités réductrices statistiquement similaires ($p > 0,05$). Les différences constatées entre les cépages analysés pourraient être liées à la teneur en composés phénoliques qui diffère d'un échantillon à l'autre. En effet, de nombreux travaux contribuent le pouvoir réducteur aux composés phénoliques constituant la matrice végétale (Huang *et al.*, 2005 ; Ribeiro *et al.*, 2008 ; Fabri *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009).

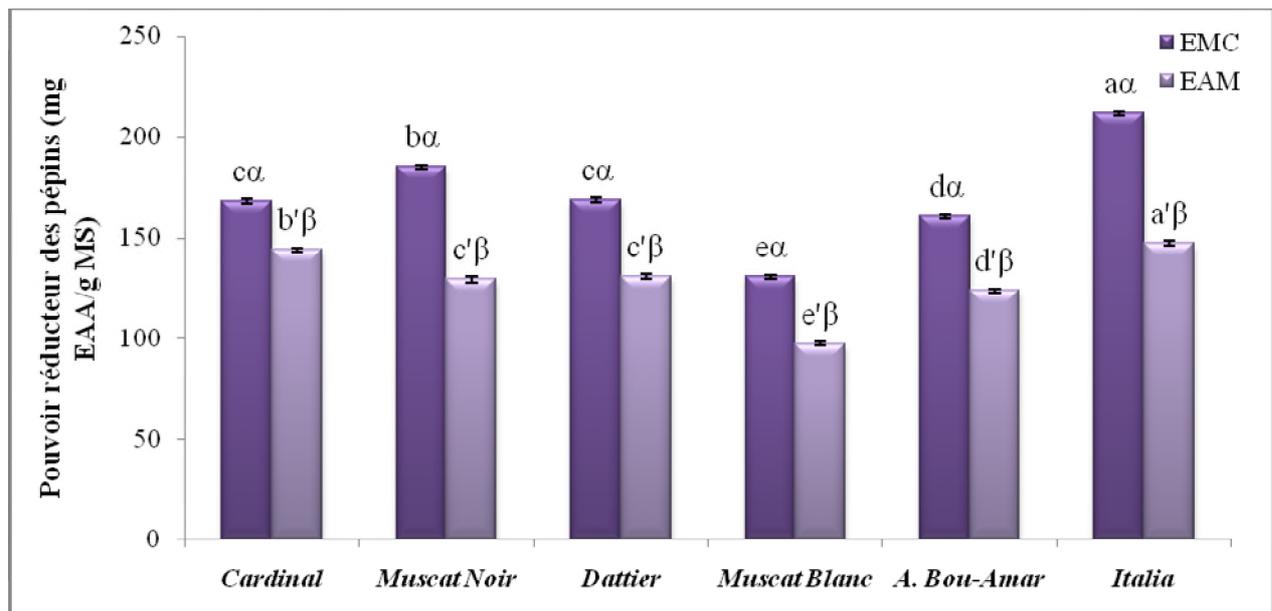


Figure 41 : Pouvoir réducteur des pépins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'activité réductrice des pépins, évaluée par le test FRAP, est rapportée dans les travaux d'Anastasiadi *et al.* (2010) et de Jara-Palacios *et al.* (2014), mais la comparaison avec nos résultats n'est pas possible. En effet, il est difficile de trouver des résultats similaires sur la capacité antioxydante des raisins et il est également difficile de les comparer en raison des différences dans les méthodes d'analyse utilisées (FRAP, ORAC, oxydation des lipides, etc.) et aussi en raison des différences dans l'expression des résultats.

Selon les résultats enregistrés, les extraits de pépins obtenus par la technique EMC exercent le meilleur pouvoir réducteur en comparaison avec ceux obtenus par EAM. Une baisse de 14 % (Cardinal) à 30 % (Muscat Noir et Italia) de cette capacité réductrice est observée. Ces observations sont similaires à celles notées pour les teneurs en composés phénoliques totaux et les concentrations en tanins condensés dosés par HPLC. Une relation étroite entre l'activité réductrice des extraits de pépins et leur contenu phénolique peut être établie. Par ailleurs, l'Epicatechine-SH et *trans*-Catéchine-SH sont réduites en appliquant les microondes. Guendez *et al.*, (2005) ainsi que Gonzalez-Paramas *et al.* (2004), ont montré que ces molécules sont impliquées dans l'activité antioxydante.

I.2. Pouvoir réducteur des pellicules

La figure 42 montre les résultats relatifs à l'activité réductrice du fer des pellicules des raisins étudiés. L'analyse statistique indique que le pouvoir réducteur des extraits de pellicules des raisins étudiés obtenus par EMC est classée comme suit: *Muscat Noir* > *Ahmar Bou-Amar* = *Italia* > *Cardinal* > *Dattier* > *Muscat Blanc*. Dans le cas des extraits obtenus par l'application des microondes, l'analyse statistique révèle le même ordre sauf pour le cépage *Italia* qui présente une activité réductrice significativement plus élevée que celle du cépage *Ahmar Bou-Amar*.

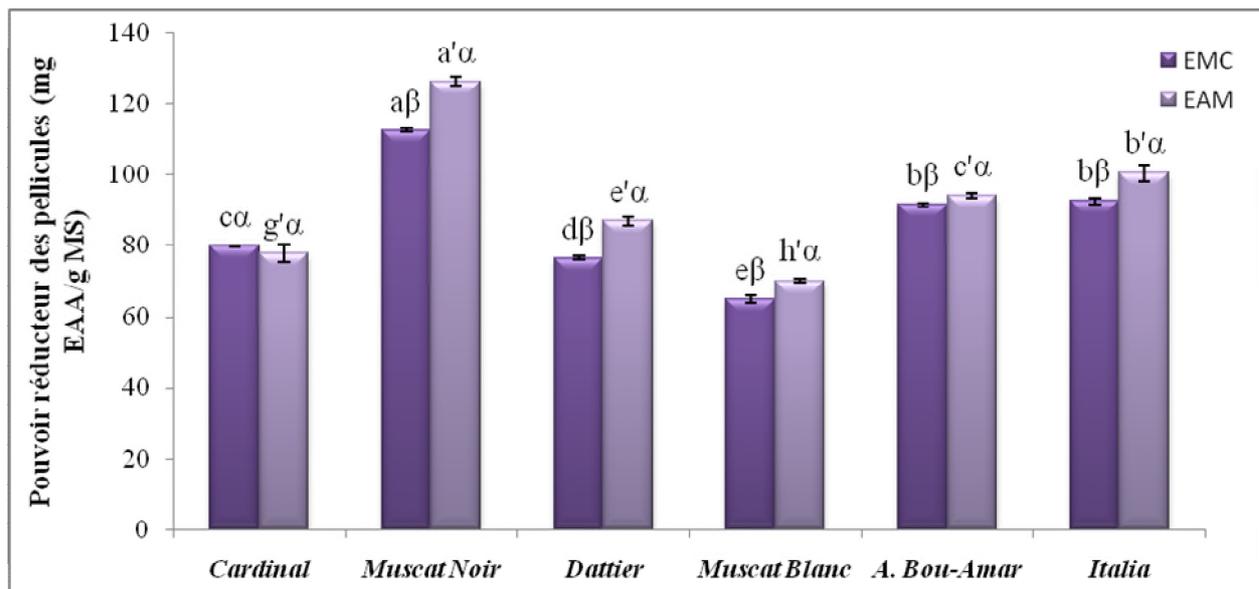


Figure 42 : Pouvoir réducteur des pellicules.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Selon les résultats obtenus, la pellicule du *Muscat Noir* a un pouvoir réducteur supérieur quelle que soit la technique d'extraction (112,47 et 126,35 mg EAA/g MS, obtenus par EMC et EAM, respectivement), contrairement au *Muscat Blanc* qui présente le pouvoir réducteur le plus faible (64,87 et 70,13 mg EAA/g MS, respectivement). La technique d'EAM a un effet positif et significatif sur le pouvoir réducteur de la majorité des variétés ($p < 0,05$), mais un effet non significatif sur l'activité réductrice du *Cardinal* ($p > 0,05$).

Plusieurs travaux ont évalué l'activité réductrice des pellicules de raisin mais les comparaisons sont difficiles. Ghafoor *et al.* (2010), ont obtenu une activité réductrice, au test du

molybdate d'ammonium, de la pellicule de raisin coréen allant de 0,476 à 1,878 mg/L des extraits de la variété *Campbell early* selon les conditions d'extraction. Lutz *et al.*, 2011 ont noté une activité réductrice du fer (test FRAP) des pellicules de quatre variétés de raisin allant de 3,3 à 7,7 mmol Fe²⁺/L. De même, Anastasiadi *et al.* (2014), ont enregistré une capacité réductrice du fer (test FRAP) des pellicules de quatre variétés de raisin.

I.3. Pouvoir réducteur des pulpes

Les résultats du pouvoir réducteur des échantillons de pulpes sont montrés dans la figure 43.

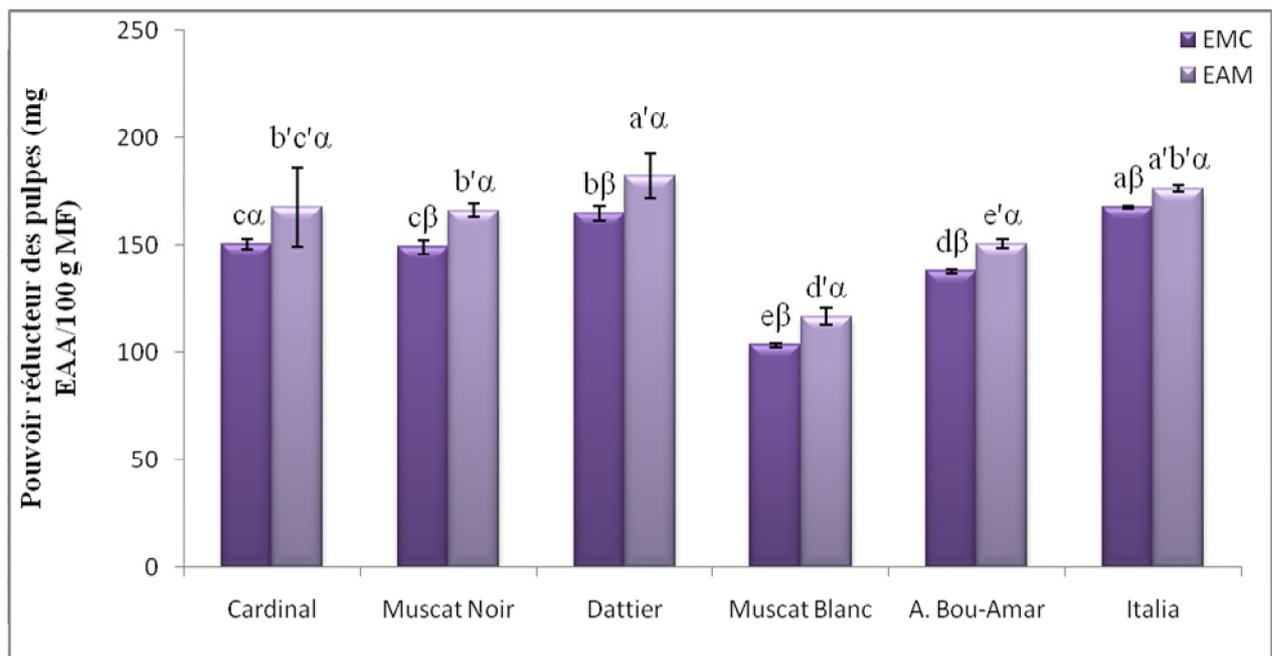


Figure 43 : Pouvoir réducteur des pulpes.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse statistique indique que quelle que soit la technique d'extraction utilisée, la meilleure activité est notée pour les cépages *Dattier* et *Italia* avec des différences non significatives dans le cas de l'EAM (182,20 et 176,22 mg EAA/100g MF, respectivement), suivie par le *Cardinal* et le *Muscat Noir* avec des activités statistiquement identiques ($p < 0,05$), puis par *Ahmar Bou-Amar* et en dernier le *Muscat Blanc* (103,39 et 116,74 mg EAA/100g MF,

pour les extraits obtenus par EMC et EAM, respectivement). Les différences trouvées entre les variétés sont probablement dues au contenu phénolique qui diffère d'une variété l'autre.

La méthode d'extraction affecte l'activité réductrice des extraits de pulpes. Les pouvoirs réducteurs des extraits obtenus par la technique d'EAM, sont significativement plus importants comparativement à ceux des extraits obtenus par la technique conventionnelle ($p < 0,05$); l'EAM influence positivement l'activité réductrice des échantillons de pulpes quelle que soit la variété en question. Ces résultats sont en accord avec les résultats des différents dosages ; les microondes permettent de mieux libérer les différentes classes polyphénoliques qui contribuent à l'activité réductrice.

II. Pouvoir anti-radical DPPH^{*}

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) est un radical libre largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998 ; Suhaj, 2006 ; Mohsen et Ammar, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). La méthode est basée sur la capacité des composés à agir en tant que piègeurs de radical en donnant un atome d'hydrogène (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998 ; Conforti *et al.*, 2008 ; Diouf *et al.*, 2009 ; Sharma et Bhat, 2009).

Expérimentalement, lorsqu'un volume défini de l'extrait est additionné à un volume déterminé de la solution DPPH^{*}, quelle que soit la matrice végétale étudiée, l'absorbance du mélange réactionnel diminue et devient stable dans un laps de temps court, ainsi la solution change de couleur instantanément du violet sombre au jaune pâle.

II.1. Pouvoir anti-radical DPPH^{*} des pépins

L'activité antiradicalaire DPPH^{*} des extraits de pépins obtenus par les deux méthodes d'extraction est illustrée dans la figure 44.

L'activité la plus élevée, quelle que soit la méthode d'extraction, est celle des pépins du cépage *Italia* avec 949,31 $\mu\text{mol ET/g MS}$, suivie par les deux variétés *Muscat Noir* et *Dattier* avec une différence non significative (865,93 et 847,12 $\mu\text{mol ET/g MS}$, respectivement). En troisième position vient le cépage *Ahmar Bou-Amar* (778,90 $\mu\text{mol ET/g MS}$). Le *Muscat Blanc* exerce l'activité antiradicalaire DPPH^{*} la plus faible (513,69 $\mu\text{mol ET/g MS}$). La différence du pouvoir antiradicalaire DPPH^{*} entre les échantillons est probablement due à l'effet variétal et à la teneur de leurs composés phénoliques. En effet, la réduction du radical DPPH^{*} par les extraits végétaux, a été attribuée par plusieurs auteurs à la présence de composés phénoliques qui cèdent

facilement des protons pour le réduire (Tepe *et al.*, 2007 ; Kubola et Siriamornpun, 2008 ; Sarikurkcü *et al.*, 2008 ; Diouf *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009). Leur capacité antioxydante varie d'un composé à l'autre et émane une synergie entre eux et/ou avec des constituants présents dans les extraits (Philpott *et al.*, 2004 ; Tachakittirungrod *et al.*, 2007; Bourgou *et al.*, 2008).

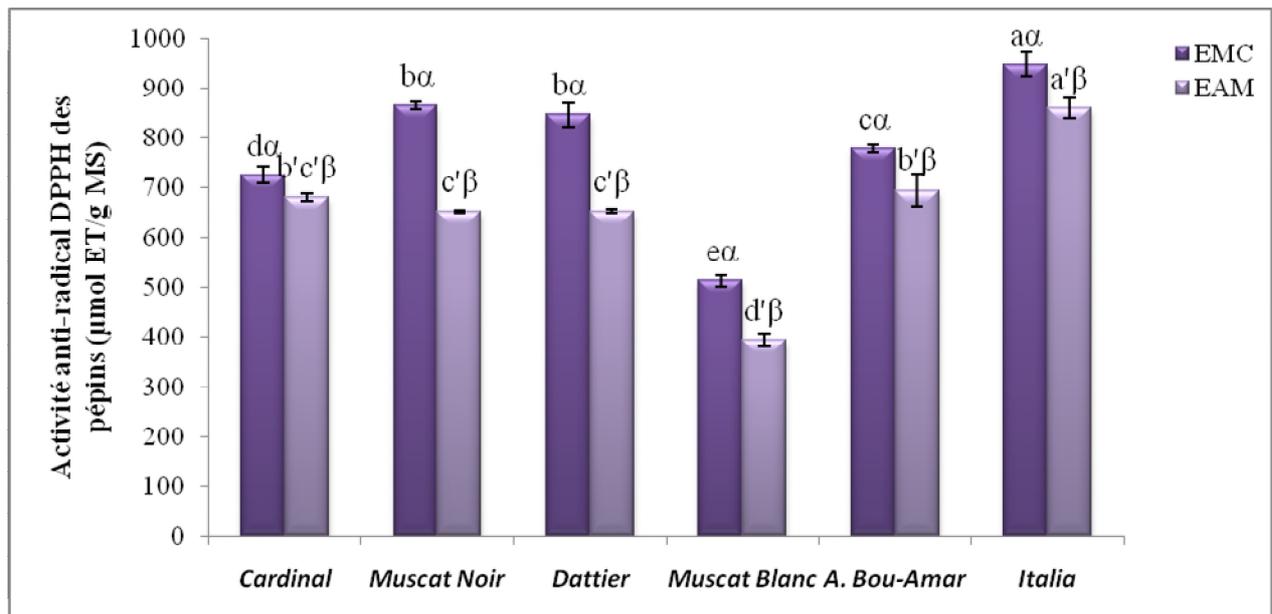


Figure 44 : Activité antiradicalaire DPPH^{*} des pépins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Le test de LSD a permis de différencier les activités anti-radicalaires des extraits obtenus par EMC et par la technique EAM en faveur de la première. Les microondes induisent une diminution de l'activité antiradicalaire des pépins de toutes les variétés de raisins analysés, mais avec des degrés variables. L'activité la plus touchée est celle du cépage *Muscat Noir* (25%), suivie par les cépages *Dattier* et *Muscat Blanc* (23%). Une diminution d'environ 19% est constatée pour le cépage *Cardinal*. Enfin, l'activité exprimée par les cépages *Ahmar Bou-Amar* et *Italia* est la moins affectée par la chaleur engendrée par les microondes ; une réduction de 10% est enregistrée. Ces résultats sont en agrément avec ceux obtenus dans la partie des dosages des

antioxydants ; La chaleur a probablement dégradé les molécules contribuant à l'activité antiradicalaire.

II.2. Pouvoir anti-radical DPPH^{*} des pellicules

Les résultats de l'activité anti-radical DPPH^{*} des extraits de pellicules des variétés de raisins étudiées, obtenus par les deux méthodes d'extraction, sont représentés dans la figure 45

L'extrait du *Muscat Noir*, obtenu par l'extraction conventionnelle, est caractérisé par la activité la plus prononcée (532,41 $\mu\text{mol ET/g MS}$), suivi par le *Cardinal* (450,08 $\mu\text{mol ET/g MS}$). Des activités similaires, d'une moyenne de 373,90 $\mu\text{mol ET/g MS}$, sont obtenues dans les cépages *Ahmar Bou-Amar*, *Muscat Blanc* et *Dattier* ($p > 0,05$). L'activité anti-radical DPPH^{*} la moins élevée est enregistrée dans la variété *Italia* avec environ 319,20 $\mu\text{mol ET/g MS}$.

Concernant les extraits obtenus par EAM, l'étude statistique indique que l'extrait du *Muscat Noir* manifeste toujours l'activité anti-radicalaire la plus élevée (557,07 $\mu\text{mol ET/g MS}$), suivi par le *Cardinal* (468,31 $\mu\text{mol ET/g MS}$) puis *Ahmar Bou-Amar* (427,02 $\mu\text{mol ET/g MS}$). En quatrième place viennent les deux variétés *Muscat Blanc* et *Dattier*, avec des différences non significatives ($p > 0,05$). *Italia* se distingue par son activité antioxydante la plus faible (328,68 $\mu\text{mol ET/g MS}$) avec une différence non significatif du *Dattier*.

Des différences très apparentes entre l'activité antioxydante, évalué par le test DPPH^{*}, de 24 variétés de raisins sont observées par Costa *et al.*, (2014) ; de 1,78 μmol (*Bastardo*) à 299,99 (*Grenache*). C'est résultats sont inférieurs de ceux obtenus dans le présent travail. Au contraire, Lago-Vanzela *et al.* (2011a), ont enregistré une activité plus prononcée que celles obtenues dans la présente investigation ; 714,0 $\mu\text{mol/g MS}$ dans la pellicule de la variété *Bordô*. Les écarts trouvés entre les différentes études peuvent être liés à la différence du matériel végétal appartenant à des variétés différentes et à la méthode d'extraction des antioxydants y compris les polyphénols. En effet, le contenu phénolique est fortement affecté par les facteurs génotype et environnemental (Lago-Vanzela *et al.*, 2011b). D'autre part, Lago-Vanzela *et al.* (2011b), ont obtenu des activités antiradicalaire DPPH^{*} de l'ordre de 312 (*Clara*) et 680 (*Morena*) $\mu\text{mol/g MS}$, nos résultats appartiennent à cet intervalle.

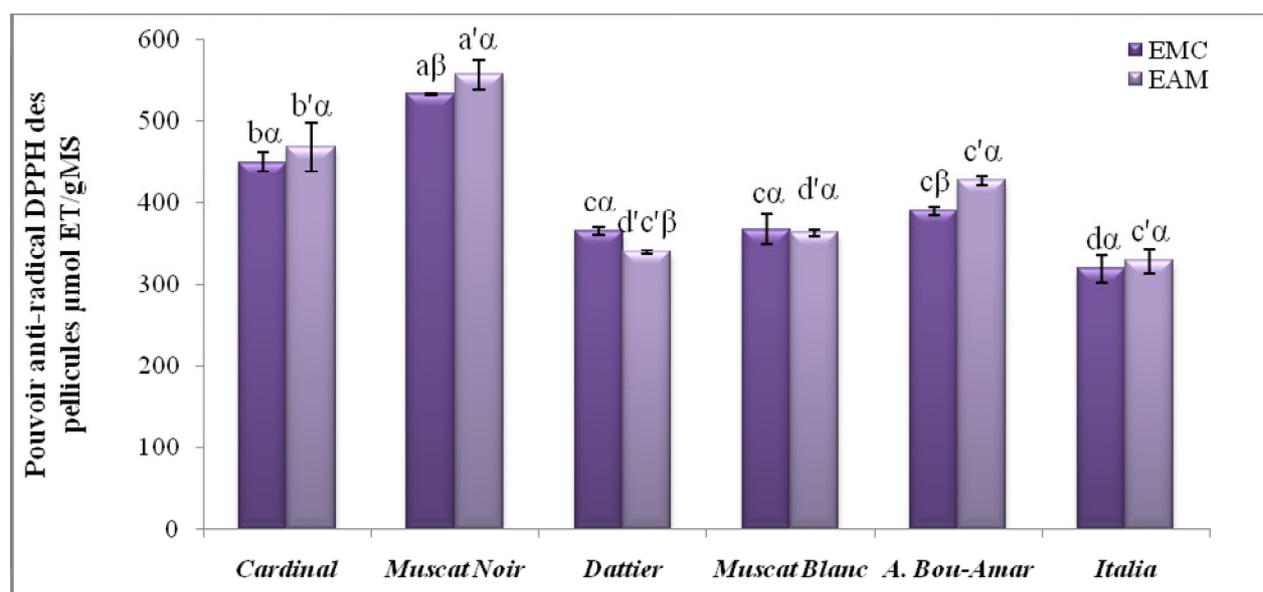


Figure 45 : Activité antiradicalaire DPPH^{*} des pellicules.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'étude de l'impact de la méthode d'extraction sur l'activité antioxydante des pellicules de raisins indique que l'effet n'est pas homogène sur tous les cépages. Dans le cas des cépages *Dattier*, *Muscat Blanc* et *Italia*, il n'y a pas d'effet significatif entre les deux méthodes d'extraction, par contre une influence positive de la méthode d'EAM est observée dans le cas du *Cardinal* et du *Muscat Blanc*.

II.3. Pouvoir anti-radical DPPH^{*} des pulpes

Les extraits de pulpes exercent aussi le pouvoir de piéger le radical DPPH^{*} avec des degrés différents selon le cépage et la technique d'extraction, les résultats sont illustrés dans la figure 46.

L'étude de l'effet de la méthode d'extraction révèle des différences significatives quelle que soit la variété ; les microondes affectent positivement l'activité antiradicalaire ($p < 0,05$). Dans le cas des extraits obtenus par EMC, l'analyse statistique divise les six variétés en quatre groupes, le *Dattier* possède l'activité anti-radicalaire la plus élevée (385,76 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$), suivi par *Ahmar Bou-Amar* et *Italia* (320,10 et 317,24 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$, respectivement) qui exercent des activités statistiquement similaires ($p > 0,05$). Le *Cardinal* et Le *Muscat Noir* viennent en

troisième position (228,39 et 230,98 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$, respectivement. L'activité antiradicalaire DPPH^{*} la plus faible est notée pour le *Muscat Blanc* (156,96 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$).

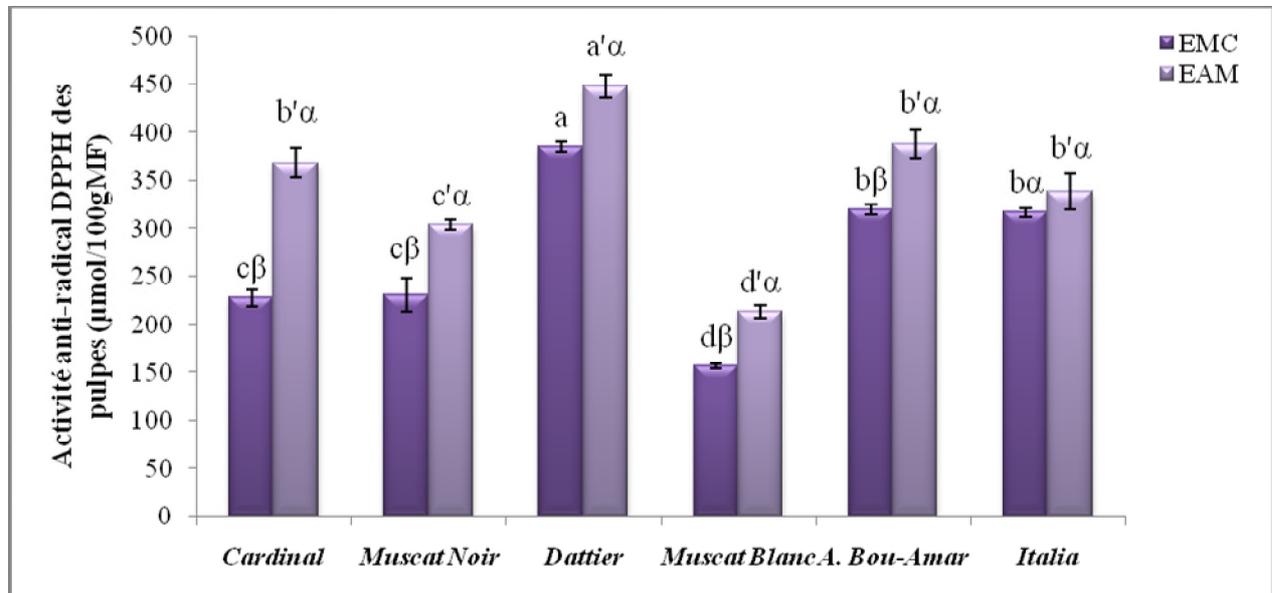


Figure 46: Activité antiradicalaire DPPH^{*} des pulpes

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Quant aux extraits obtenus par EAM, les quantités en antioxydant varient de 214,18 (*Muscat Blanc*) à 448,16 (*Dattier*) $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$. L'étude de l'effet variétal sur l'activité anti-radical DPPH^{*} donne les résultats suivants : *Dattier* > *Ahmar Bou-Amar* = *Cardinal* > *Italia* > *Muscat Noir* > *Muscat Blanc*.

Les résultats du pouvoir anti-radical DPPH^{*} des extraits obtenus par macération conventionnelle s'avèrent appartenant à l'intervalle trouvé par Costa *et al.* (2014), qui ont obtenu des activités anti-radical DPPH^{*} des pulpes de raisins allant de 18 (*Alfrocheiro*) à 312 $\mu\text{mol}/100\text{g MF}$ (*Camarate* et *Moreto Boal*). De même, Lago-Vanzela *et al.*, (2011a) et Lago-Vanzela *et al.*, (2011b), ont enregistré des activités antiradicalaire DPPH^{*} des extraits de pulpes, respectivement de 186 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$ (*Bôrdo*) et de 210 (*Clara*) à 316 $\mu\text{mol ET}/100\text{g MF}$ (*Morena*) ; Ces résultats sont proches de ceux trouvés dans le présent travail concernant les

extraits obtenus par EMC. Néanmoins, ceux obtenus par EAM, sont plus élevés de ceux des auteurs cités ci-dessus, excepté les deux *Muscat* ; cela peut être expliqué par la différence dans la méthode d'extraction et aussi par l'effet variétal. En effet, l'activité antioxydante des pulpes de raisins est reliée à la présence d'un mélange de composés phénoliques ayant de bonnes propriétés antioxydantes (Baiano et Terracone, 2011 ; Nile *et al.*, 2013). Ces derniers sont mieux récupérés par l'EAM.

III. Pouvoir anti-radical ABTS^{•+}

La méthode d'ABTS^{•+} se base sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par un antioxydant.

III.1. Pouvoir anti-radical ABTS^{•+} des pépins

Les résultats de l'activité antiradicalaire ABTS^{•+} des pépins de raisins étudiés exprimés en équivalent Trolox/g MS sont illustrés dans la figure 47.

Les résultats montrent que tous les extraits, quelle que soit la méthode d'extraction, ont la capacité de piéger le radical ABTS^{•+}, dont l'intensité dépend du cépage et de la technique d'extraction. L'étude statistique révèle que, les extraits obtenus par EMC présentent des activités plus prononcées que celles des extraits obtenus par l'application des microondes. Cela pourrait être dû à la quantité en polyphénols qui est plus élevée dans les premiers extraits.

L'extrait obtenu par EMC des pépins du cépage *Italia* exerce le pouvoir anti-radical ABTS^{•+} le plus élevé (769,10 μmol ET/g MS), suivi par les extraits du *Muscat Noir*, du *Cardinal* et *Dattier* avec des différences non significatives ($p > 0,05$). En troisième position se trouve *Ahmar Bou-Amar* avec une différence non significative du *Dattier*. Le *Muscat Blanc* présente l'activité anti-radical ABTS^{•+} la plus faible (537,52 μmol/g MS).

Concernant les extraits obtenus par l'EAM, l'analyse statistique de l'effet de la variété indique l'ordre suivant : *Italia* > *Cardinal* > *Muscat Noir* > *Ahmar Bou-Amar* = *Dattier* > *Muscat Blanc*. Quelle que soit la méthode d'extraction, les pépins de la variété *Italia* sont les plus actifs et ceux de la variété *Muscat Blanc* sont les plus faibles vis-à-vis le piégeage du radical libre ABTS^{•+}.

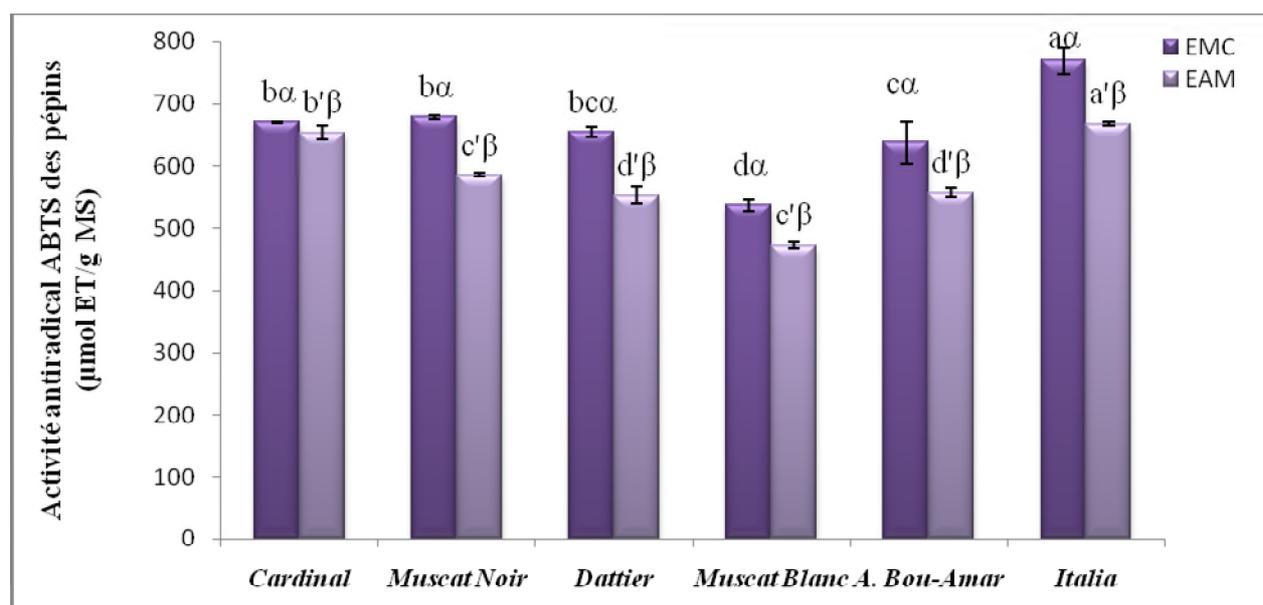


Figure 47: Activité antiradicalire ABTS^{•+} des pépins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $a > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les résultats obtenus de l'activité anti-radical ABTS^{•+} sont dans l'intervalle trouvé par Costa *et al.* (2014) ; ces auteurs ont enregistré des activités antiradicalaires des pépins de 24 variétés de raisin allant de 77,59 (*Monverde*) jusqu'à 867,81 ET $\mu\text{mol/g MS}$ (*Carignan Noir*). Nos résultats s'avèrent inférieurs de ceux obtenus par Jara-Palacios *et al.* (2014) dans l'extrait de pépins de la variété *Zalema* (966,4 ET $\mu\text{mol/g MS}$), cette différence est probablement due à l'effet variétal.

III.2. Pouvoir anti-radical ABTS^{•+} des pellicules

L'activité anti-radical ABTS^{•+} des extraits de pellicules obtenus par les deux méthodes d'extraction sont illustrés dans la figure 48.

L'analyse statistique révèle des différences significatives entre l'activité anti-radical ABTS^{•+} des extraits de pellicules obtenus dans les mêmes conditions d'extraction ($p < 0,05$). La pellicule du *Muscat Noir* présentent l'activité la plus élevée, elle est de 513,82 et 496,84 $\mu\text{mol ET/g MS}$, suivie par celle du *Cardinal* (422,87 et 474,19 $\mu\text{mol ET/g MS}$). *Ahmar Bou-Amar* vient en troisième position avec 369,28 et 390,60 $\mu\text{mol ET/g MS}$, suivi par le *Dattier* puis *Italia*. Le *Muscat Blanc* présente quant à lui une faible activité (288,52 et 295,31 $\mu\text{mol ET/g MS}$). Des travaux similaires ont montré des variations entre l'activité antioxydante des pellicules de

différentes variétés de raisin qui sont expliquées par le contenu quantitatif et qualitatif en polyphénols. Costa *et al.* (2014), ont enregistré des activités antiradicalaire DPPH^{*} allant de 1,13 (*Bastardo*) jusqu'à 292,05 $\mu\text{mol/g MS}$ (*Tinta Miuda*) de pellicules de 24 variétés de raisin. Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude, excepté la variété *Muscat Blanc*. D'autre part, Jara-Palacios *et al.* (2014), ont enregistré une activité de 423,2 $\mu\text{mol/g MS}$ dans l'extrait de la variété *Zalema*. Les résultats obtenus pour les variétés rouges sont relativement proches de ceux trouvés par ces derniers auteurs.

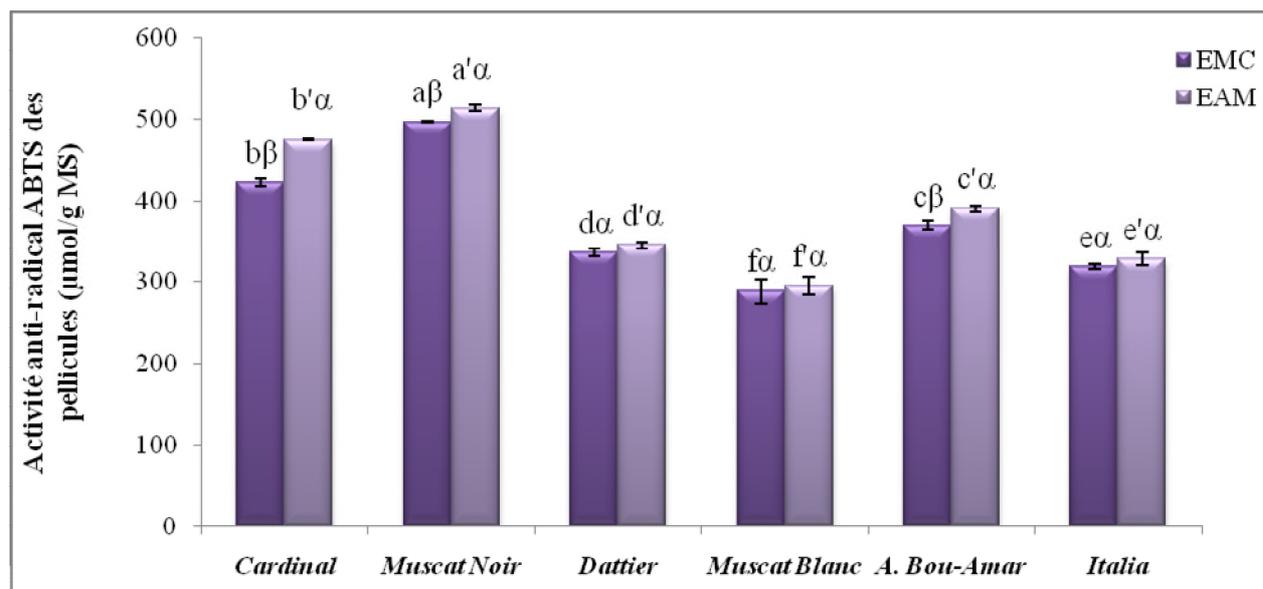


Figure 48: Activité antiradicalaire ABTS⁺⁺ des pellicules.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse de l'effet de la méthode d'extraction indique que l'activité antioxydante des extraits de pellicules des cépages *Cardinal*, *Muscat Noir* et *Ahmar Bou-Amar* obtenus par EAM est plus élevée que celle des extraits obtenus par EMC. Par contre, aucun effet significatif n'a été trouvé entre les deux méthodes d'extraction dans le cas des autres cépages. L'effet de la méthode d'extraction sur l'activité anti-radical ABTS⁺⁺ est probablement lié à son effet sur le contenu phénolique et particulièrement aux différentes classes phénoliques qui répondent différemment à la méthode d'extraction. En effet, l'étude de l'effet de la méthode d'extraction a montré un impact non significatif sur la plupart des molécules phénoliques des pellicules.

III.3. Pouvoir anti-radical ABTS^{•+} des pulpes

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de pulpes de raisins présentent la capacité à piéger le radical ABTS^{•+} (fig. 49).

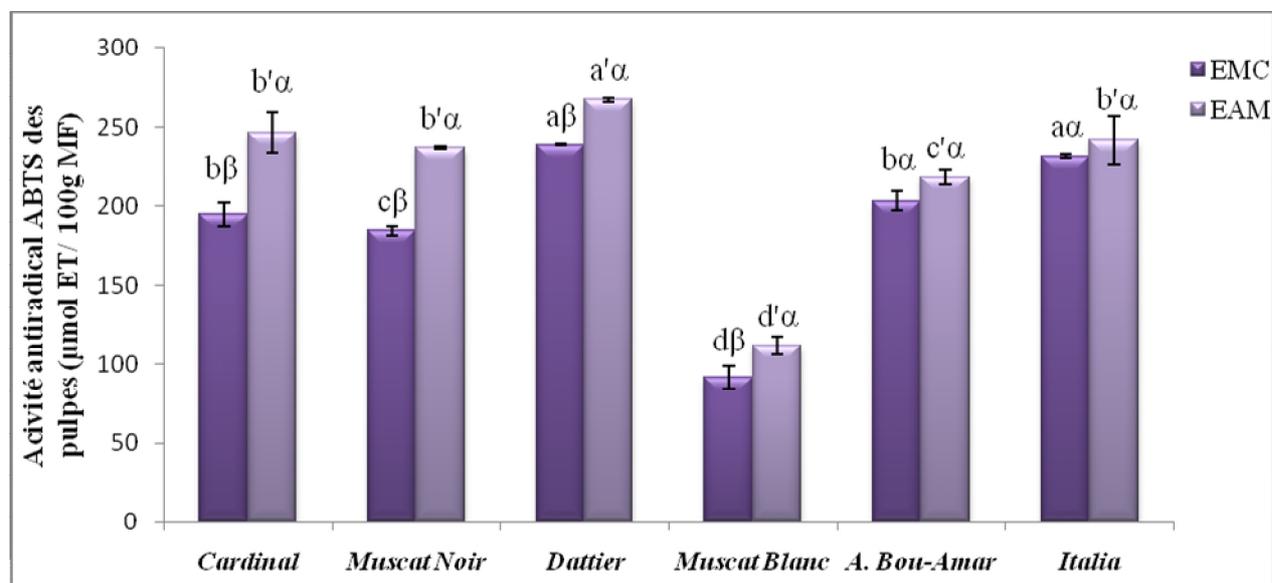


Figure 49: Activité anti-radical ABTS^{•+} de pulpes.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'étude statistique ($p < 0,05$) indique que les extraits de pulpes du *Dattier* et d'*Italia* obtenus avec l'EMC sont les plus actifs vis-à-vis la neutralisation du radical ABTS^{•+} avec des différences non significatives (238,51 et 231,53 μmol/ 100g MF, respectivement). Suivis dans l'ordre décroissant par *Ahmar Bou-Amar* et *Cardinal* (203,23 et 194,48 μmol/ 100g MF, respectivement) avec des différences non significatives, puis le *Muscat Noir* (183,98 μmol/ 100g MF) et enfin, le *Muscat Blanc* qui a une activité anti-radicalaire trois fois moins importante que celle du *Dattier* et d'*Italia* (91,50 μmol/ 100g MF).

Quant aux extraits obtenus par l'application des microondes, le test LSD révèle des différences non significatives entre les pouvoirs antiradicalaires des cépages *Cardinal*, *Italia* et le *Muscat Noir* qui sont classés en deuxième position, avec une moyenne de 241,82 μmol/ 100g MF, après le *Dattier* (267,29 μmol/ 100g MF). *Ahmar Bou-Amar* vient en troisième position avec une activité anti-radicalaire de l'ordre de 218,23 μmol/ 100g MF. Le *Muscat Blanc*

prononce l'activité la plus faible (111,65 $\mu\text{mol}/100\text{g MF}$). Les différences retrouvées entre les différents cépages sont probablement dues au contenu phénolique et/ou aux propriétés antioxydantes des molécules phénoliques constituant telle ou telle variété.

L'effet de la méthode d'extraction indique que l'EAM affecte positivement l'activité anti-radicalaire pour la majorité des cépages ($p < 0,05$), excepté la variété *Italia*, où cet effet n'est pas significatif ($p > 0,05$). Cela peut être expliqué par les teneurs élevées en polyphénols totaux dans les extraits obtenus par la seconde méthode. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Nkhili *et al.* (2009) ; l'activité antioxydante de l'extrait du thé vert obtenus par l'EAM est plus élevée que celle de l'extrait obtenu avec la technique conventionnelle.

Des teneurs relativement proches de celles retrouvées dans la présente étude sont obtenues dans les travaux réalisés par Costa *et al.* (2014) sur les pulpes de raisin de différents cépages qui varient de 4 (*Alfrocheiro*) à 255 (*Tina Miuda*) $\mu\text{mol}/100\text{ g MF}$.

IV. Pouvoir de chélation du fer

L'ionisation du FeCl_2 libère des ions ferreux (Fe^{2+}) qui se complexent avec la ferrozine pour former un complexe coloré qui absorbe à 562nm (Sarradin *et al.*, 2005). Les composés phénoliques rentrent en compétition avec la ferrozine pour se lier avec le Fe^{2+} et réduisent ainsi leur concentration dans le milieu, diminuant de ce fait l'intensité de la réaction entre le Fe^{2+} et la ferrozine, ce qui limite la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine. La mesure de la réduction de l'intensité de la couleur permet l'estimation de la capacité chélatrice des agents chélateurs coexistants (Lim *et al.*, 2007).

IV.1. Pouvoir de chélation du fer des pépins

Les résultats obtenus (fig. 50) montrent que les extraits des pépins de raisin ont la capacité de chélater le fer avec des différences non significatives entre les cépages *Dattier*, *Muscat Noir* et *Cardinal* qui présentent un pourcentage de chélation moyen de 37,02% à une concentration de 20mg/ml. La variété *Italia* enregistre un pouvoir de chélation du fer significativement plus élevé (38,18%). L'activité chélatrice du fer la plus faible est notée pour le cépage *Muscat Blanc* (30,92%). Des réductions significatives, de 7% (*Cardinal*) à 11% (*Ahmar Bou-Amar*), sont observées, quelle que soit la variété, dans le pouvoir de chélation du fer en appliquant les microondes pour la préparation des extraits.

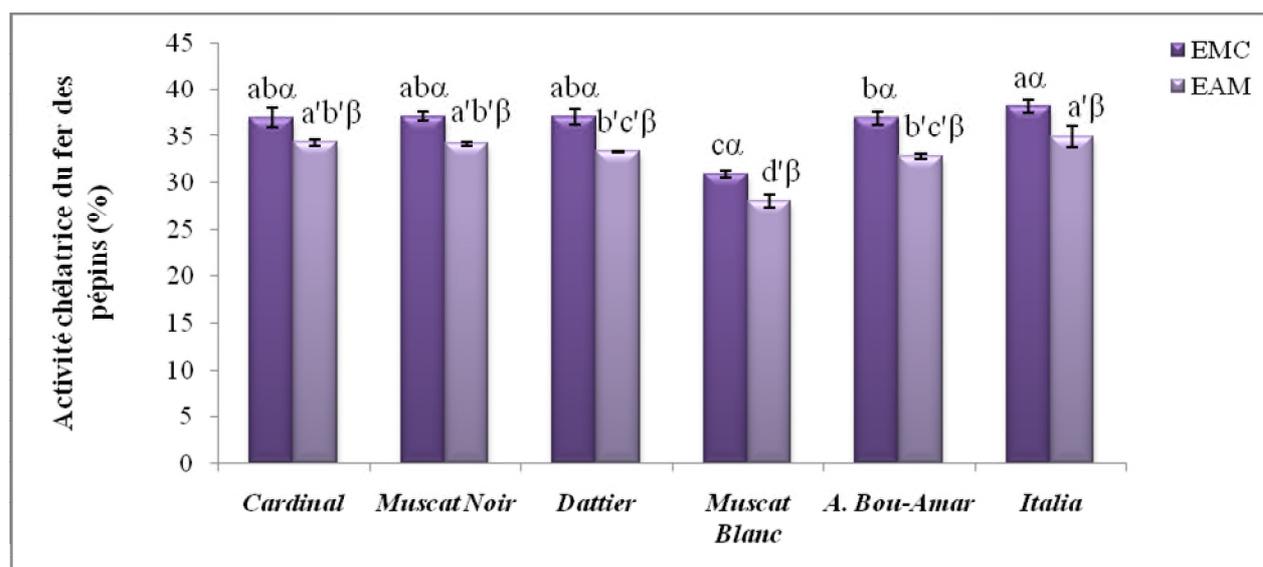


Figure 50 : Activité chélatrice du fer des pépins.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $a > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

IV.2. Pouvoir de chélation du fer des pellicules

Le pouvoir chélateur du fer des extraits de pellicules obtenus à une concentration de 40mg/ml par les deux méthodes d'extraction sont montrés dans la figure 51.

Le pouvoir de chélation du fer le plus élevé est obtenu par les extraits du *Cardinal* (37,91 et 39,89%) et du *Muscat Noir* (37,27 et 36,82%), quelle que soit la méthode d'extraction, avec des différences significatives dans le cas de l'EAM et non significatives dans le cas de l'autre méthode ($p < 0,05$). Concernant les extraits obtenus par EMC, la deuxième position est occupée par *Ahmar Bou-Amar* (32,31%), suivi par le *Muscat Noir* (29,80%) et en dernier les deux cépages *Italia* et *Dattier* avec des différences non significatives (27,57%). Quant aux extraits obtenus par EAM, la troisième place est occupée par les quatre cépages *Muscat Blanc*, *Ahmar Bou-Amar*, *Dattier* et *Italia* avec des différences non significatives (29,85%).

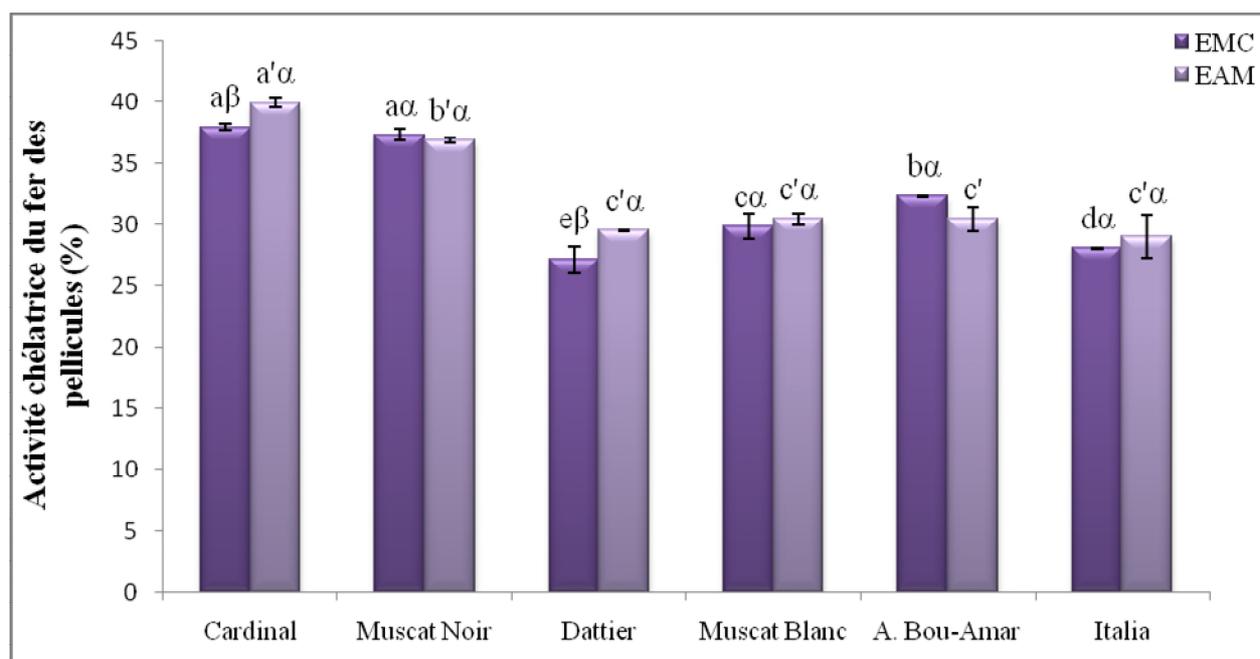


Figure 51: Activité chélatrice du fer des pellicules.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

La méthode d'extraction ne semble pas avoir un effet sur l'activité chélatrice du fer des cépages *Cardinal*, *Dattier* et *Ahmar Bou-Amar*. Par contre, l'activité chélatrice, des trois autres cépages, est affectée positivement par l'EAM.

Katalinic *et al.* (2010) dans leur étude sur les pellicules de 14 variétés de raisin, ont noté une capacité chélatrice de ces variétés dont les IC_{50} varient de 21,0 mg EAG/ml (*Medna*) et 665 mg EAG/ml (*Rudezuša*). Les comparaisons entre les résultats cités et les résultats obtenus dans la présente étude ne sont pas possibles en raison de la différence entre les expressions des résultats.

IV.3. Pouvoir de chélation du fer des pulpes

Le pouvoir chélateur du fer des différents extraits de pulpes obtenus par les deux méthodes d'extraction à une concentration de 800mg/ml, est présenté dans la figure 52.

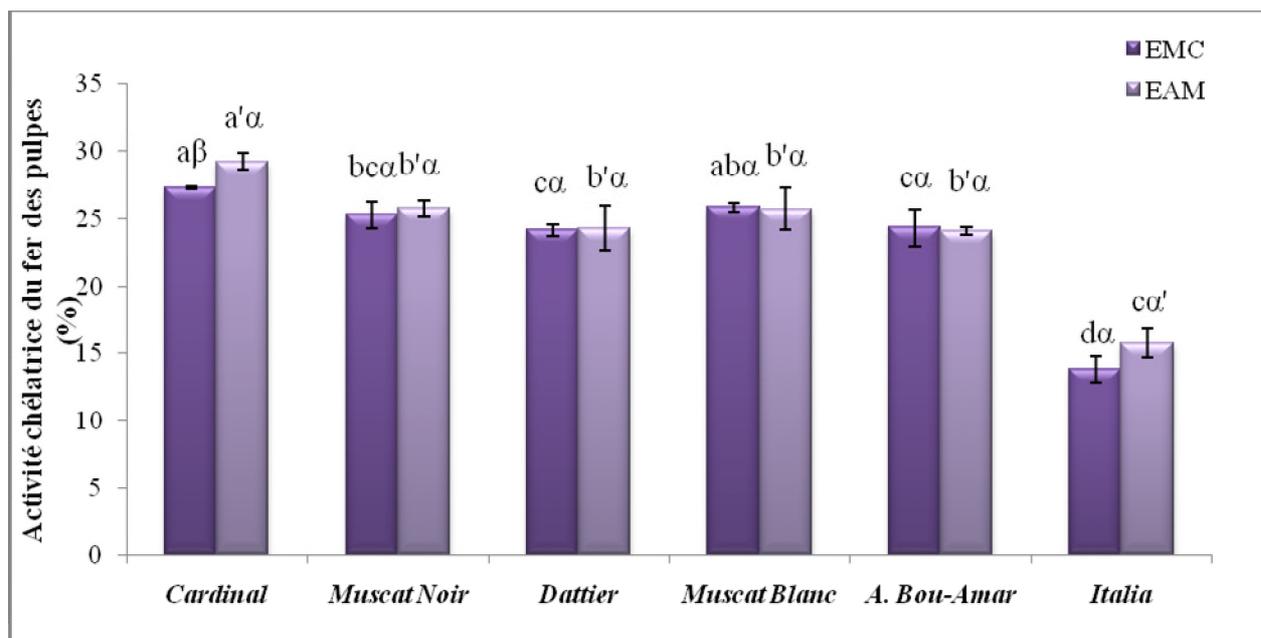


Figure 52: Activité chélatrice du fer des pulpes.

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant ; $a > b > c > d > e > f$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EMC ; $a' > b' > c' > d' > e' > f'$: indiquant les différences entre les extraits obtenus par EAM ; $\alpha > \beta$: indiquant les différences entre les méthodes d'extraction pour chaque cépage. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'analyse statistique permet de classer les extraits de pulpes des différents cépages selon leur capacité chélatrice du fer comme suit : *Cardinal* = *Muscat Blanc* \geq *Muscat Noir* \geq *Ahmar Bou-Amar* = *Dattier* $>$ *Italia* ; et selon l'EAM comme suit : *Cardinal* $>$ *Muscat Noir* = *Muscat Blanc* = *Ahmar Bou-Amar* = *Dattier* $>$ *Italia*.

Le pouvoir chélateur du fer des extraits de pulpes varie de 13,84% (*Italia*) et 29,24% (*Cardinal*).

L'étude statistique de l'effet de la méthode d'extraction indique clairement qu'elle est non significative dans la majorité des cas. Par contre, dans le cas du *Cardinal* l'extraction assistée par microondes donne un extrait avec une activité chélatrice du fer meilleure.

V. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante

L'analyse de la corrélation entre deux variables permet de vérifier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables. Le lien entre deux variables quantitatives est calculé à partir du coefficient de corrélation de Pearson.

V.1. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pépins

Les principaux résultats des teneurs en composés bioactifs et des activités antioxydantes obtenues à partir des extraits de pépins des six variétés étudiées, obtenus par les deux méthodes d'extraction, montrent des corrélations positives hautement significatives (Tableau XXXII). Des coefficients de corrélation de 0,93 ; 0,91 ; 0,93 et 0,87 sont obtenus entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydante évaluée par le pouvoir réducteur, l'activité antiradicalaire DPPH[•], ABTS^{•+}, et le pouvoir chélateur du fer, respectivement. De même, des corrélations hautement significatives sont observées entre ces activités et les teneurs en flavanols ; les coefficients de corrélation ainsi obtenus entre cette catégorie de molécules et l'activité antiradicalaire DPPH[•], ABTS^{•+}, le pouvoir réducteur du fer et l'activité chélatrice du fer, sont respectivement comme suit : 0,96 ; 0,89 ; 0,93 et 0,80. Ceci indique que, globalement, les composés phénoliques et particulièrement les tanins condensés jouent un rôle majeur dans l'activité antioxydante des extraits de pépins de raisins. Il apparaît que la Catéchine joue un rôle majeur dans l'activité antioxydante des extraits de pépins ; en effet, des coefficients de corrélation hautement significatifs sont obtenus avec l'activité antioxydante évaluée par les différents tests. Des corrélations positives sont enregistrées entre les dérivés d'Epicatechine et l'activité antioxydante ; elles sont significatives dans le cas des extraits obtenus par extraction conventionnelle et non significatives dans le deuxième cas, ce qui peut être dû à leur concentration dans les différents extraits.

Des résultats similaires sont obtenus par plusieurs auteurs. Gonzalez-Paramas *et al.* (2004), ont obtenu des corrélations élevées ($r > 0,8$) entre les flavanols totaux et individuels (catéchine et épicatechine) et l'activité antiradicalaire ABTS^{•+} des pépins de raisin. Jara-palacios *et al.* (2014), ont noté des coefficients de corrélation de 0,94 et 0,84 entre les polyphénols totaux des pépins de raisin et leur l'activité antioxydante mesurée par les tests ABTS^{•+} et FRAP, respectivement. Anastasiadi *et al.* (2010), ont obtenu des coefficients de 0,98 et de 0,97 entre les composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante évaluée par les tests FRAP et DPPH[•], respectivement.

Tableau XXXII: Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pépins.

		Tanins	Caroténoïdes	Pouvoir réducteur	Anti-radical DPPH	Anti-radical ABTS	Pouvoir chélateur	Dérivés de catéchine	Dérivés d'Epicatechine
Méthodes d'extraction	Polyphénols totaux	0,87***	0,37	0,93***	0,91***	0,93***	0,87***	0,83***	0,72**
	Tanins	1	0,10	0,96***	0,89***	0,93***	0,80***	0,94***	0,64***
	Caroténoïdes		1	0,13	0,11	0,07	0,14	0,04	0,65*
	Pouvoir réducteur			1	0,92***	0,98***	0,82***	0,96***	0,65**
	Anti-radical DPPH				1	0,91***	0,90***	0,91***	0,51*
	Anti-radical ABTS					1	0,86***	0,90	0,63*
	Pouvoir chélateur						1	0,72*	0,57*
	Dérivés de catéchine							1	0,49*
	Dérivés d'Epicatechine								1
EAM	Polyphénols totaux	0,94***	0,13	0,97***	0,90***	0,96***	0,89***	0,76**	0,38
	Tanins	1	0,06	0,87***	0,91***	0,90***	0,83***	0,89***	0,37
	Caroténoïdes		1	0,15	-0,11	0,14	0,27	-0,04	0,49*
	Pouvoir réducteur			1	0,90***	0,96***	0,94***	0,64**	0,33
	Anti-radical DPPH				1	0,86***	0,88***	0,82***	0,10
	Anti-radical ABTS					1	0,87***	0,63*	0,53*
	Pouvoir chélateur						1	0,67**	0,22
	Dérivés de catéchine							1	0,05
	Dérivés d'Epicatechine								1

* : corrélation significative ($p < 0,05$); ** : corrélation hautement significative ($p < 0,01$); corrélation très hautement significative ($< 0,001$)

De même, Guendez *et al.*, (2005), ont obtenu un coefficient de corrélation de 0,79 entre l'activité antiradicalaire DPPH et le contenu phénolique total des pépins de neuf variétés de raisin. Ces mêmes auteurs ont enregistré des corrélations positives entre le pouvoir anti radical DPPH et la catéchine, épicatechine avec des coefficients de détermination $r^2=0,66$ et $0,53$, respectivement dans les extraits de pépins, mais des corrélations non significatives entre le DPPH et les ECG et les EGC. De même, Gonzalez-Paramas *et al.* (2004), ont trouvé des corrélations significatives entre la catéchine et l'épicatechine des extraits de pépins et leur activité antioxydante évaluée par le test ABTS^{•+}. Quant à Bozan *et al.* (2008), ils ont obtenu une faible corrélation entre les unités constitutives des flavanols et le pouvoir antioxydant évalué par le test ORAC dans les extraits de pépins. Ces observations peuvent indiquer que le type de composés phénoliques et probablement le degré de polymérisation ont un effet sur le pouvoir antioxydant des échantillons (Baiano et Terracone, 2011). D'après Counet et Collin, (2003), l'activité antioxydante augmente avec le degré de polymérisation.

Baiano et Terracone (2001), signalent que l'activité anti-radicalaire accrue des pépins de raisin émane d'autres composés n'appartenant pas à la classe des polyphénols tels l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les tocophérols et les vitamines.

La teneur en caroténoïdes n'est corrélée avec aucun paramètre ; cela pourrait être dû à sa faible concentration dans les pépins de raisin et par conséquent à sa faible contribution dans l'activité antioxydante. D'autre part, des corrélations positives et significatives sont obtenues entre le procédé de l'inhibition du radical DPPH et celui du pouvoir réducteur ce qui peut s'expliquer par la présence d'antioxydants ayant la capacité de donner des électrons et des protons.

V.2. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pellicules

L'analyse de la corrélation entre les antioxydants et l'activité antioxydante obtenue à partir des extraits de pellicules est illustrée dans le tableau (XXXIII)

Les résultats indiquent que les différentes activités antioxydantes sont bien corrélées avec les teneurs en composés phénoliques totaux et en proanthocyanidines. Une corrélation hautement significative ($p < 0,001$) est obtenue entre l'activité antiradicalaire (DPPH et ABTS) et les polyphénols totaux ($r > 0,70$) ainsi que les tanins condensés ($r > 0,90$).

Tableau XXXIII: Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pellicules.

		Tanins	Flavonols	Acides phénols	Caroténoïdes	Pouvoir réducteur	Anti-radical DPPH	Anti-radical ABTS	Pouvoir chélateur	Dérivés de Catéchine	Dérivés d'Epicatechine
Méthodes d'extraction	Polyphénols totaux	0,60**	-0,26	0,003	-0,54	0,59**	0,72***	0,73***	0,41	0,72***	0,73***
	Tanins	1	0,02	0,59**	0,09	0,60**	0,92***	0,96***	0,91***	0,96***	0,91**
	Flavonols		1	0,74***	0,34	-0,29	-0,18	-0,07	-0,13	-0,01	-0,19
	Acides phénols			1	0,39	0,14	0,35	0,50*	0,53*	0,51*	0,41
	Caroténoïdes				1	0,15	-0,08	-0,003	0,05	0,05	-0,26
	Pouvoir réducteur					1	0,57*	0,75***	0,45	0,73**	0,54*
	Anti-radical DPPH						1	0,93***	0,85***	0,93***	0,56*
	Anti-radical ABTS							1	0,85**	0,99***	0,92
	Pouvoir chélateur								1	0,82***	0,91**
	Dérivés de catéchine									1	0,89***
EMC	Dérivés d'Epicatechine										1
	Polyphénols totaux	0,85***	0,05	0,28	-0,07	0,66**	0,76**	0,79**	0,50*	0,89***	0,53*
	Tanins	1	-0,16	0,37	0,07	0,65**	0,96***	0,95***	0,75**	0,95***	0,67**
	Flavonols		1	0,77**	0,38	0,33	0,22	0,01	0,05	0,11	0,25
	Acides phénols			1	0,41	0,05	0,32	0,54*	0,49*	0,34	0,71
	Caroténoïdes				1	0,03	0,09	0,01	0,21	0,09	0,20
	Pouvoir réducteur					1	0,56*	0,56*	0,15	0,71**	0,22
	Anti-radical DPPH						1	0,92***	0,78**	0,93***	0,62*
	Anti-radical ABTS							1	0,86***	0,92***	0,84***
	Pouvoir chélateur								1	0,67**	0,88***
EAM	Dérivés de catéchine									1	0,59*
	Dérivés d'Epicatechine										1

* : corrélation significative ($p < 0,05$) ; ** : corrélation hautement significative ($p < 0,01$) ; corrélation très hautement significative ($p < 0,001$).

Une corrélation positive significative ($r > 0,60$) est enregistrée entre les pouvoir réducteur et les teneurs en polyphénols totaux et en tanins condensés. La même valeur est notée pour la corrélation entre le pouvoir chélateur du fer et la teneur en polyphénols totaux, mais un coefficient de corrélation plus élevé ($r > 0,75$) est observé entre cette activité antioxydante et les tanins condensés. Ceci semble signifier que les composés phénoliques totaux, et particulièrement les tanins, jouent un rôle majeur dans l'activité antioxydante des extraits de pellicules de raisins. Par contre, la contribution des flavonols, des acides phénols et des caroténoïdes dans l'activité antioxydante des pellicules étudiées s'avère relativement faible. En effet, des corrélations négatives sont notées entre l'activité antioxydante, mesurée avec les différentes méthodes, et les flavonols.

La même constatation est notée pour les acides phénoliques concernant le pouvoir réducteur ($r = -0,15$). Les acides phénoliques contribuent avec un effet significatif à l'activité anti-radicalaire ABTS et le pouvoir de chélation du fer ($r \geq 0,50$) et avec un effet non significatif à l'activité anti-radicalaire DPPH ($r = 0,35$). Ceci est probablement dû à la proportion élevée des tanins dans la teneur totale en composés phénoliques des extraits de pellicules qui représentent environ 68 à 90 % selon les cultivars. Les fortes corrélations observées entre les tests de capacité antioxydante et dérivés de catéchine et d'épicatéchine dans les fractions de pellicules reflètent qu'il est un contributeur majeur aux propriétés antioxydantes.

Les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux rapportés par la littérature. Des corrélations hautement significatives sont obtenues par Lutz *et al.* (2011) entre les polyphénols des pellicules de quatre variétés de raisin et leur activité réalisée par le test DPPH ($r = 0,94$), l'activité réductrice du fer ($r = 0,94$) et le test ORAC ($r = 0,73$). Ces mêmes auteurs, ont obtenu des corrélations significatives entre les différents tests cités ci-dessus et les teneurs en catéchine des pellicules. D'autre part, Katalinic *et al.* (2010), ont enregistré des corrélations élevées entre le test FRAP et les polyphénols totaux des pellicules ($r = 0,95$) et aussi une corrélation positive et significative entre le test DPPH et les teneurs en composés phénoliques totaux des pellicules de quatorze variétés de raisin Croate. De même, Baiano et Terracone (2001), ont obtenu des coefficients de corrélation hautement significatifs entre l'activité antiradicalaire DPPH ($r = 0,83$) et ABTS ($r = 0,85$) et les polyphénols des pellicules de sept variétés de raisin.

V.3. Corrélation entre antioxydants et activité antioxydante des pulpes

A partir des résultats obtenus, une bonne corrélation positive est observée entre la teneur en antioxydants, des extraits de pulpes des différents cépages étudiés, et l'activité antioxydante évaluée par le test du pouvoir réducteur du fer et le piégeage des radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+}; des coefficients de corrélation de 0,80 ; 0,80 et de 0,96 sont obtenus entre les polyphénols totaux et les activités antioxydante citées, respectivement (tableau XXXIX). Contrairement aux pellicules, les acides phénols et les flavonols jouent un rôle important dans l'activité antioxydante des pulpes. En effet, des corrélations positives et significatives sont enregistrées entre les teneurs en ces composés bioactifs et l'activité antioxydante ($r \geq 0,60$). Des résultats similaires sont rapportés par Baiano et Terracone (2011). Selon Sanchez- Moreno *et al.* (1998), les acides hydroxycinnamiques exercent une activité antioxydante plus forte que celle de α -tocophérol, de l'acide tannique, de la quercétine, de la rutine, de la BHA.

Par contre, ces acides phénols et ce flavanols exercent une corrélation négative sur l'activité chélatrice du fer. Le pouvoir de chélation du fer n'est corrélé avec aucun paramètre ; en revanche, une corrélation positive, mais non significative, est observée avec les tanins condensés. L'obtention d'une activité chélatrice du fer pourrait être expliquée par la nature et propriétés des composés phénoliques constituant chaque extrait et éventuellement par un effet synergique entre les composés phénoliques dans un extrait et/ou par la contribution d'autres molécules en synergie avec les polyphénols et/ou entre eux.

En effet, certains auteurs signalent que l'activité antioxydante accrue émane d'autres composés n'appartenant pas à la classe des polyphénols tels l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les tocophérols et les vitamines (Tawaha *et al.*, 2007 ; Pincemail *et al.*, 2007; Tachakittirungrod *et al.*, 2007 ; Costa *et al.*, 2014).

Les résultats du présent travail concordent avec ceux rapportés dans la littérature. Lutz *et al.* (2011), ont noté des coefficients de corrélation positifs et significatifs de 0,76 ; 0,55 et 0,91 entre l'activité antioxydante évaluée par les tests DPPH, FRAP et ORAC, respectivement dans les jus de raisin. Aussi, Dani *et al.* (2007), ont observé des corrélations positives et significatives entre l'activité antiradicalaire DPPH et les composés phénoliques ($r=0,62$) et la catéchine ($r=0,55$) dans les jus de raisin. Contrairement à Baiano et Terracone (2001), qui ont obtenu des corrélations non significatives entre l'activité antioxydante et les antioxydants des pulpes de raisin.

Tableau XXXIV: Corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des extraits de pulpes.

		Tanins	Flavonols	Acides phénols	Caroténoïdes	Acide ascorbique	Pouvoir réducteur	Anti-radical DPPH	Anti-radical ABTS	Pouvoir chélateur	Dérivés de Catéchine	Dérivés d'Epicatechine
Méthodes d'extraction	Polyphénols totaux	0,30	0,94***	0,90***	-0,67**	0,01	0,80***	0,80***	0,86***	0,22	0,62**	0,14
	Tanins	1	0,48*	0,04	-0,47	0,06	0,20	0,61*	0,35	0,23	0,47	-0,43
	Flavonols		1	0,80***	-0,55*	-0,13	0,60*	0,80***	0,73***	-0,12	0,61**	-0,14
	Acides phénols			1	-0,60*	0,26	0,85***	0,68**	0,81***	-0,45	0,71***	0,42
	Caroténoïdes				1	-0,17	-0,80***	-0,55*	-0,75***	-0,19	-0,41	-0,20
	Acide ascorbique					1	0,51*	0,39	0,41	-0,70***	0,56*	0,78
	Pouvoir réducteur						1	0,75***	0,95***	-0,40	0,64**	0,62**
	Anti-radical DPPH							1	0,88***	0,44	0,78**	0,19
	Anti-radical ABTS								1	-0,40	0,63**	0,47
	Pouvoir chélateur									1	0,53*	0,68**
	Dérivés de Catéchine										1	0,24
	Dérivés d'Epicatechine											1
EAM	Polyphénols totaux	0,53*	0,88***	0,88***	-0,53*	0,16	0,76**	0,82***	0,74**	-0,50*	0,50*	0,55*
	Tanins	1	0,69*	0,29	-0,47	-0,14	0,34	0,76**	0,38	0,23	0,95***	0,96***
	Flavonols		1	0,80***	-0,55*	-0,30	0,59*	0,86***	0,63**	-0,09	0,59*	0,70**
	Acides phénols			1	-0,31	0,02	0,57*	0,54*	0,50*	-0,56*	0,31	0,26
	Caroténoïdes				1	-0,17	-0,88***	-0,75**	-0,91***	-0,11	-0,50	-0,38
	Acide ascorbique					1	0,46	0,05	0,33	-0,67*	0,07	-0,19
	Pouvoir réducteur						1	0,77**	0,97***	-0,37	0,42	0,29
	Anti-radical DPPH							1	0,83***	-0,07	0,67*	0,78**
	Anti-radical ABTS								1	-0,23	0,39	0,37
	Pouvoir chélateur									1	0,09	0,20
	Dérivés de Catéchine										1	0,84***
	Dérivés d'Epicatechine											1

* : corrélation significative ($p < 0,05$) ; ** : corrélation hautement significative ($p < 0,01$) ; *** : corrélation très hautement significative ($p < 0,001$).

Les résultats de l'étude des corrélations entre les antioxydants et l'activité antioxydante des différentes parties de la baie de raisin, indiquent que la capacité antioxydante est fonction de la concentration et la nature des composés phénoliques. Cependant, certaines corrélations faibles indiquent que cette activité ne dépend pas seulement des composés phénoliques, mais qu'elle reflète plutôt les activités combinées de diverses molécules décrivant ainsi le rapport probable structure-activité entre eux (Baiano et Terracone, 2011 ; Lutz *et al.*, 2011).

D'après Baiano et Terracone (2011), les flavonoïdes possèdent un pouvoir antioxydant puissant et les flavanols galloylés, présent en teneurs élevés dans les pépins, sont plus actifs que leurs homologues non-galloylés. Selon plusieurs auteurs, l'activité antioxydante peut être affectée par de nombreux facteurs : la structure des composés phénoliques en particuliers le degré et la position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique de la molécule (Balasundram *et al.*, 2005 ; Scherer et Gody, 2009 ; Sharififar *et al.*, 2009 ; Baiano et Terracone, 2011), la glycosylation et présence d'autres groupements donneurs de protons (Cai *et al.*, 2004 ; Tachakittirungrod *et al.*, 2007). En effet, les flavonols aglycones comme la quercétine, la myricétine et le kaempferol qui contiennent plusieurs groupements hydroxyles ont une activité antioxydante supérieure à celle de leurs dérivés glycosylés (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Cai *et al.*, 2004 ; Scherer et Gody, 2009 ; Anastasiadi *et al.*, 2010).

Conclusion

Conclusion

Cette étude est focalisée sur la détermination quantitative et qualitative des différentes classes poly-phénoliques des trois parties de la baie de raisins de six cépages de table cultivés à Bejaia (Algérie), tout en comparant l'efficacité de deux méthodes d'extraction: EAM et EMC, vis-à-vis ces substances bioactives ainsi que leur activité antioxydante. Ce travail a permis entre autre, de déterminer les propriétés physico-chimiques ainsi que la composition en vitamine C et en caroténoïdes des cépages étudiés et les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques totaux à partir des trois fractions de la baie de raisin en appliquant une méthode statistique par les plans d'expériences (méthodologie de surfaces de réponses). Les meilleures conditions d'extraction des anthocyanes à partir des pellicules des cépages rouges sont aussi obtenues dans cette étude, en utilisant un procédé simple (facteur par facteur),

Les analyses physicochimiques indiquent que le taux d'humidité varie selon les fractions et les cépages étudiés : les pulpes des raisins sont plus riches en eau (75,91% à 84,49%) que les pellicules (54,17% à 67,65%) et les pépins (13,24% à 18,29%). Le pH des jus de raisins est compris entre 3,68 et 3,8 et leurs acidités titrables varient entre 3,28 et 4,13 g/L ; le degré Brix varie de 17,06 à 20,56%, ce qui confirme l'état mature des cépages étudiés. Toutes les parties de la baie de raisins renferment des caroténoïdes dont les teneurs diffèrent selon les matrices et les cépages, les pépins paraissent plus riches. Le dosage de la vitamine C des jus des raisins étudiés révèle des teneurs allant de 10,08 à 15,12 mg EAA/100g MF.

Le type du solvant affecte significativement les teneurs en composés phénoliques des extraits des trois matrices des baies de deux cépages « *Ahmar Bou-Amar* » et « *Italia* ». L'acétone est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques totaux à partir des pulpes et des pellicules, l'éthanol est le solvant le plus efficace pour les pépins. Par ailleurs, les résultats de l'optimisation de l'extraction des anthocyanes à partir des pellicules des cépages rouges, indiquent que l'éthanol 75% est le meilleur solvant pour leur extraction.

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques totaux par deux méthodes d'extraction (EMC et EAM) est réalisée à partir des trois parties de la baie de raisin du cépage « *Ahmar Bou-Amar* », à l'aide d'une méthodologie expérimentale statistique. Les conditions d'extraction optimales des composés phénoliques totaux à partir des trois fractions de la baie de

raisin par les deux méthodes d'extraction sont ainsi obtenues et diffèrent selon la nature de la matrice végétale. Pour les composés phénoliques l'étude de la validation indique des données mathématiques comparables aux valeurs expérimentales quelque soit la nature de la matrice végétale et de la méthode d'extraction.

Le dosage des composés phénoliques totaux à partir des extraits obtenus avec ces deux méthodes d'extraction révèle que l'extraction par macération conventionnelle a donné de meilleurs rendements en composés phénoliques totaux à partir des pépins (70,72 à 136,43 mg EAG/ g MS) ; des réductions de l'ordre de 4,16% à 33,95% sont enregistrées en utilisant l'EAM. Contrairement aux pépins, l'utilisation de la technique d'EAM révèle des rendements plus élevés en polyphénols totaux dans les pellicules et les pulpes jusqu'à 28% et 30%, respectivement avec une réduction du temps d'extraction jusqu'à 98%.

L'identification et la quantification des différentes classes phénoliques des trois fractions des baies des six raisins, ont été effectuées par chromatographie liquide à haute performance ce qui constitue une première pour ces six cépages, cultivés dans la région de Bejaia. Cette caractérisation a révélé que le profil quantitatif et qualitatif varie d'une matrice à une autre et d'un cépage à l'autre et que les teneurs en composés phénoliques individuels et totaux sont étroitement liés à la méthode d'extraction.

Les polyphénols sont répartis d'une manière hétérogène dans tout le fruit. Les raisins étudiés contiennent de grandes quantités de composés phénoliques, principalement concentrés dans les pépins et les pellicules. Le contenu phénolique des raisins dépend principalement des variétés étudiées et non pas de la couleur de la pellicule. Les pépins ne renferment que des tanins condensés avec des teneurs très importantes (24,13 ; *Muscat Blanc* à 94,99 g EC/ Kg MS; *Italia*). Quant aux pellicules, les dosages ont révélés la présence de plusieurs classes poly-phénoliques à savoir les tanins condensés (16,53 à 30,21 g EC/Kg MS), les acides phénols (218,87 à 865,64 mg/ Kg MS), les flavonols (2721,99 à 7807,73 mg/kg MS) ainsi que les anthocyanes dans le cas des variétés rouges (272,71 à 3227,24 mg EMv3G/Kg MS). Les pulpes renferment une large gamme d'acides phénols, les concentrations totales varient de 31,74 à 126,27 mg/Kg MF. Des flavonols sont également présents dans les pulpes mais avec de faibles concentrations. De même, les résultats indiquent la présence des tanins dans les pulpes.

La méthode d'extraction a un impact significatif sur la composition en composés phénoliques totaux et individuels, dont la variation dépend du type de la fraction étudiée (pépins,

pellicules ou pulpes) et de la nature du composé à extraire. En effet, les tanins condensés totaux des pépins sont mieux extraits par EMC que par EAM, quant à ceux de pellicules aucune différences n'a été trouvée entre les des deux méthodes. Un effet positif de l'EAM sur l'extraction des tanins des pulpes a été enregistré.

Les unités constitutives des tanins condensés (flavan-3-ol en position terminale, intermédiaire/extension) répondent différemment à la technique d'extraction ; Il est remarquable que les unités d'extension en particulier la *trans*-Catéchine-SH et l'Épicatéchine-3-O-Gallate-SH sont affectées négativement par l'EAM, quelque soit la variété en question et la matrice végétale. Le contraire est noté pour les unités terminales : la catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine-3-O-gallate, dans la majorité des cas. Par ailleurs, la teneur en épicatéchine-SH, la molécule majoritaire des tanins de toutes les matrices, est réduite dans les extraits obtenus par EAM, dans le cas des pépins, un effet non significatif dans le cas des pellicules et positif dans le cas des pulpes, ce qui est expliqué par la différence de la structure des proanthocyanidines de chaque matrice. Par conséquent, une relation étroite entre l'effet de la méthode d'extraction et le DPM, est établie pour la première fois dans ce travail ; Plus le DPM est faible, plus l'extraction assistée par microondes affecte négativement la récupération des tanins à partir des matrices étudiées.

L'efficacité d'extraction des acides phénols individuels et totaux dépend de la thermosensibilité du composé en lui-même et/ou de la matrice végétale (pulpe et pellicule). Les acides phénols totaux sont mieux extraits par l'EAM, quelque soit le cépage ou la fraction (pulpes et pellicules). Les acides phénols individuels répondent différemment à la technique d'extraction ; les acides non-identifiés (AP1, AP2), coumarique et coumarique sont mieux récupérés par l'EAM que l'EMC. L'acide caftarique est mieux récupéré par l'EAM à partir des pulpes mais aucun effet significatif n'est noté dans le cas des pellicules. L'acide fertarique est négativement affecté par l'EAM.

La technique d'extraction n'a aucun effet significatif sur les rendements d'extraction en flavonols totaux à partir des pellicules des différents cépages étudiés. Néanmoins, l'efficacité de l'extraction dépend des flavonols individuels. Quatre types de flavonols sont identifiés : les dérivés du myricétol, du quercétol, du kaempférol et de l'isorhamnitol ; les flavonols type myricétol, quercétol-aglycone et *cis*-kaempférol-3-G sont significativement mieux extraits par l'EAM. Par contre, l'isorhamnitol-3-G est mieux récupéré par l'EMC. Au niveau des pulpes, l'influence de la technique d'extraction des flavonols individuels et totaux est variable selon les variétés. En effet, la récupération des flavonols par EAM est de 14 à 36% plus efficace que

l'EMC à l'exception des variétés *Muscat Blanc* et *Italia*, où le taux d'extraction des flavonols totaux et individuels obtenus avec les deux méthodes d'extraction ne présente aucune différence significative.

Treize anthocyanes sont détectées dans les pellicules des cépages *Cardinal* et *Muscat Noir* ; cinq anthocyanes glycosilées sont identifiées : Delphinidine-3-G; Cyanidine-3-G; Pétunidine-3-G; Péonidine-3-G et Malvidine-3-G dont certaines d'entre elles se sont reproduites dans plusieurs schémas d'acylation (acétylées, coumaroylées). Quant au cépage *Ahmar Bou-Amar*, il ne contient que de la cyanidine-3-G. La méthode d'extraction affecte considérablement le profil quantitatif individuel et total des anthocyanes. Une réduction en teneur totale de 31% pour tous les cépages est notée en utilisant EAM comme moyen d'extraction ; les anthocyanes glycosilées et coumaroylées sont sensibles aux hautes températures. Cependant, l'anthocyane acétylée détectée dans la pellicule du *Cardinal* s'avère plus résistante à la température.

Trois méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, les résultats indiquent que les extraits étudiés ont tous des activités inhibitrices des radicaux libres DPPH et ABTS, des aptitudes à réduire des métaux de transition (fer) et la capacité chélatrice du fer.

Les pépins du cépage *Italia* ont une capacité antioxydante très prononcée quelque soit la méthode d'extraction et la méthode d'évaluation de cette activité et le cépage *Muscat Blanc* possède l'activité la plus faible, cela étant en relation directe avec leur contenu en composés phénoliques totaux et en tanins condensés. En effet, de bonnes corrélations (en moyenne $r = 0,90$) sont établies entre les paramètres antioxydants analysés, excepté les caroténoïdes. Il est à souligner que l'EAM réduit l'activité antioxydante des pépins.

La pellicule du cépage *Muscat Noir*, vu sa richesse en composés phénoliques totaux et en tanins condensés, possède l'activité réductrice et inhibitrice de radicaux libres DPPH et ABTS la plus puissante, contrairement au cépage du *Muscat Blanc* qui détient l'activité antioxydante la plus faible. Des corrélations positives et significatives sont obtenus ($r > 0,60$). Les flavonols et les acides phénols ne contribuent pas à l'activité antioxydante des pellicules, de même pour les caroténoïdes. La méthode d'extraction n'a pas d'effet significatif sur leurs activités antioxydantes.

La pulpe du cépage *Dattier* exerce un pouvoir antioxydant le plus élevé en comparaison à d'autres cépages ; la pulpe du *Muscat Blanc* possède la plus faible capacité antioxydante. Il apparait, que les acides phénols, les tanins condensés et les polyphénols totaux contribuent à la

capacité antioxydante ; de bonnes corrélations significatives sont observées ($r \geq 0,60$). L'acide ascorbique, les caroténoïdes ne contribuent pas au pouvoir antioxydant des pulpes. La méthode d'extraction EAM affecte positivement cette activité.

L'étude de l'efficacité de la méthode d'extraction des polyphénols permet de mieux comprendre la réponse pour chaque composé phénolique individuel. Le choix d'une méthode d'extraction des composés phénoliques, EAM ou EMC, développées dans le présent travail, à partir d'une matrice végétale repose essentiellement sur les objectifs que nous fixons au préalable ; la nature des composés à extraire et de la matrice végétale à utiliser. En effet, nous montrons qu'il n'existe pas de méthode standard pour tout type de composés phénoliques et tout type de matrices végétales.

De nombreuses substances polyphénoliques sont détectées dans le présent travail sans avoir été identifiées, notamment des acides phénols de la pulpe et des flavonols des pellicules. Dans cette perspective et dans le but de compléter ce travail, il paraît important de poursuivre la caractérisation avec des méthodes permettant leur identification précise (HPLC/MS, RMN...). Ce travail d'identification devrait être mené sur la variété *Ahmar Bou-Amar* qu'est un cépage autochtone, originaire de la Kabylie et qui n'est l'objet d'aucune autre étude sur sa composition phénolique. Cette perspective est l'objet d'un projet d'étude en cours.

A la lumière de ces résultats, l'utilisation des composés phénoliques extraits à partir des raisins étudiés, particulièrement les pépins et les pellicules, paraît prometteuse dans le cadre d'un programme de lutte contre le stress oxydatif. Une réflexion et des essais sur le mode d'utilisation de ces métabolites secondaires naturellement présents dans les sous-produits de raisins méritent d'être menés pour leur utilisation à la place des antioxydants de synthèses.

De plus, il est souhaitable d'élargir l'étude à d'autres cépages particulièrement les cépages autochtones de notre pays, de tester l'activité antioxydante de ces différentes variétés *In vivo*, de sélectionner les cépages ayant des potentiels antioxydants les plus élevés afin de les commercialiser comme des raisins à haut pouvoir antioxydant et aboutir ainsi à des appellations d'origine contrôlées algériennes. Ainsi, l'Algérie, avec ses potentialités naturelles, avec son riche patrimoine génétique, pourra aisément trouver la voie de succès qui pourra lui permettre de devenir un important fournisseur du marché international en raisin de table.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Adams O.D. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57(3)**: 249-256.

Afoakwah A.N., Owusu J., Adomako C. et Teye E. (2012). Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Bio-Science and BioTechnology*, **1 (2)**: 132-140.

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74** : 636-643.

Al-Farsi M.A. et Lee C.Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, **108**: 977-985.

Alias C., Linden G. et Miclo L. (2008). Biochimie alimentaire. Ed. Dunode. Paris. pp :125-126.

Alupului A., Călinescu I. et Lavric V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, **74(2)**:129-142.

Anastasiadi M., Pratsinis H., Kletsas D., Skaltsounis A-L. et Haroutounian S.A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, **43**: 805-813.

Andjelkovic1 M., Radovanović B., Radovanovi A. et Andjelkovic A.M. (2013). Changes in Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grapes cv Vranac During Ripening. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **34(2)**:147-155.

Awika J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L. et Cisneros-Zevallos L. (2003). Screening Methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51 (23)**: 6657-6662.

Attia F. (2007). Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique et la maturation phénolique de la vigne *Vitis vinifera* L.: Etude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrenees. Thèse Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N. et Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of

bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, **117**: 426-436.

Azwanida N.N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, **4(3)**: 196. doi:10.4172/2167-0412.1000196.

Baghdikian B., Filly A., Fabiano-Tixier A.S., Petitcolas E., Fathi Mabrouki F., Chemat F. et Ollivier E. (2016). Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods. *Comptes Rendus Chimie*, **19**: 692-698.

Baiano A. et Terracone C. (2011). Varietal Differences among the phenolic profiles and antioxidant activities of seven table grape cultivars grown in the south of Italy based on chemometrics. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **59**: 9815-9826.

Balasundram N., Ai T.Y., Sambanthamurthi R., Sundram K. et Samman S. (2005). Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **4(4)**: 319-324.

Barcia M.T., Paula Becker Pertuzatti, Gómez-Alonso S., Godoy H.T. et Hermosín-Gutiérrez I. (2014). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry*, **159**: 95-105.

Bavaresco L., Fregoni C., van Zeller M.I. Gonçalves M.B. et Vezzulli S. (2009). Physiological & molecular biology of grapevine stilbenes: An Update. Ed. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*: 341-364.

Baydar N. G. (2006). Organic acid, tocopherol, and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, **42(2)**: 156-159.

Bayramoglu B., Sahin S. et Sumnu G. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, **88**: 535-540.

Beaudeau J.L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. et Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*, **21**: 144-150.

Belitz H.D., Grosch W. et Schieberle P. (2006). Food Chemistry. 4th revised and extended edition. Ed. Springer.

Benmezziane F., Cadot Y., Djamai R. et Djermoun L. (2016). Determination of major anthocyanin pigments and flavonols in red grape skin of some table grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection (HPLC-DAD). *OENO One*, **50**: 125-135.

Berset C. (2006). Antioxydants phénoliques- Structure, propriétés, sources végétales. In « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris. pp : 265-294.

- Bimakr M., Rahman R.A., Saleena Taip F., Adzahan N.M., Islam Sarker Z. et Ganjloo A. (2013).** Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. *International Food Research Journal*, **20(1)**: 331-338.
- Bordiga M., Travaglia F., Locatelli M., Coisson J.D. et Marco Arlorio M. (2011).** Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis Vinifera* L. CV. *Food Chemistry*, **127**: 180-187.
- Borel P., Drai J., Faure H., Fayol V., Galabert C., Laromiguière M. et Le Moël G. (2005).** Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. *Annales de Biologie Clinique*, **63** : 165-177.
- Boukharta M., Girardin M. et Metche M. (1994).** Procyanidols oligomeres des sarments de vigne, cépage Carignan. *Vitis*, **33** : 5-10.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. et Marzouk B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, **331** : 48-55.
- Boussetta N., Vorobiev E., Le L., Cordin-Falcimaigne A. et Lanoisellé J.L. (2012).** Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, **46**: 127-134.
- Bozan B., Tosun G. et Ozcan D. (2008).** Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry*. **109**: 426-430.
- Bramorski A., Cherem A.R., Mezdri T., Melo S.S., Deschamps F.C., Gonzaga L.V., Rockenbach I.I. et Fett R. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of *Gaylussacia brasiliensis* (camarinha) grown in Brazil. *Food Research International*, **44**: 2134-2138.
- Breksa III A. P., Takeoka G. R., Hidalgo M. B., Vilches A., Vasse J. et Ramming D.W. (2010).** Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry*, **121**:740-745.
- Brossaud F., Cheynier V., Asselin C. et Moutounet M. (1999).** Flavonoids compositional differences of grapes among site test planting of Cabernet franc. *American Journal of Enology and Viticulture*, **50 (3)**: 277- 284.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosy : Photochemistry, Medicinal plants. 2^{eme} Ed. Lavoisier. Paris. pp: 240-387.
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M. et Velić D. (2007).** Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal and Food Engineering*. **81**: 236-242.

- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Jokić S., Mujić I., Bilić M. et Velić D. (2011).** Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilized fig fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **61(3)**: 195-199.
- Bunea C-I., Pop N., Babeş A.C., Matea C., Dulf F.V. et Bunea A. (2012).** Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, **6(66)** : 1-9.
- Butkhup L., Chotvivannakul S., Gaensakoo R., Prathepha P. et Samappito S. (2010).** Study of the phenolic composition of Shiraz red grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-eastern Thailand and its Antioxidant and Antimicrobial Activity. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **31(2)**: 89-98.
- Cacace J.E. et Mazza G. (2003).** Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, **59**: 379-389.
- Cadot Y., Chevalier M. et Barbeau G. (2011).** Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91 (11)**: 1963-1976.
- Cadot Y., Chevalier M., Minana-Castello M.T. et Moutounet M. (2008).** Le potentiel phénolique du cabernet franc. Ed. Conception couverture: Terre des sciences. INRA Angers, France.
- Cadot Y., Minana Castello M.T. et Chevalier M. (2006a).** Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta*, **563**: 65-75.
- Cadot Y., Minana-Castello M.T. et Chevalier M. (2006b).** Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54(24)**: 9206-9215.
- Cadot, Y., Caillé S., Thiollet-Scholtus M., Samson A., Barbeau G. et Cheynier V. (2012).** Characterisation of typicality for wines related to terroir by conceptual and by perceptual representations. An application to red wines from the Loire Valley. *Food Quality and Preference*, **24(1)**: 48-58.
- Cai Y., Luob Q., Sunc M. et Corke H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74** : 2157-2184.
- Caillet S., Salmieri S. et Lacroix M. (2006).** Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*, **95**: 1-8.

- Cantos E., Espin J.C. et Tomas-Barberan F.A. (2002).** Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MSMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 5691–5696.
- Carbonneau A., Deloire A. et Jaillard B. (2007).** La vigne Physiologie, terroir, culture, Ed. 1 Vol.1.Dunod, Paris.
- Carrera C., Ruiz-Rodríguez A., Palma M. et Barroso C.G. (2012).** Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, **732**: 100-104.
- Casazza A.A., Aliakbarian B., Mantegna S., Cravotto G. et Perego P. (2010).** Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*. **100**: 50-55.
- Castillo-Munoz N., Fernandez-Gonzalez M., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E. et Hermosin-Gutierrez I. (2009).** Red-Color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 7883-7891.
- Castillo-Munoz N., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E. et Hermosin-Gutierrez I. (2010).** Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 699-705.
- Chaalal M., Touati N. et Louaileche H. (2012).** Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Botanica Gallica*, **159 (4)**: 467-475.
- Chauvet et Reynier (1979).** Manuel de viticulture. Ed. 3^{ème} J-B. Baillière, Paris.
- Chethan S. et Malleshi N.G. (2007).** Finger millet polyphenols: optimisation of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chemistry*, **105**: 862-870.
- Chew K.K., Ng S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., Aida W.M. et Ho C.W. (2011).** Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, **18**: 571-578.
- Cheyrier V. et Rigaud J. (1986).** HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and viticulture*, **37(4)**: 248-252.
- Cheyrier V., Guyot S. et Fulcrand H. (2006).** Composés phénoliques des boissons fermentés. In « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris pp : 211-264.
- Cheyrier V., Prieur C., Guyot S., Rigaud J. et Moutounet M. (1997).** The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. In Wine: nutritional and therapeutic benefits. *American Chemical Society*, **661**:81-93.

- Chiou A., Karathanos V. T., Mylona A., Fotini N. S., Preventi F., Andrikopoulos N. K. (2007).** Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, **102**: 516-522.
- Chira K., Suh J.H., Saucier C. et Teissédre P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**:75-82.
- Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. et Larondelle Y. (2007).** Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology*, **55**: 217-225.
- Collin S., Counet C., Callemien D. et Jerkovic V. (2006a).** Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols. In « Polyphénols et procédés ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris pp : 5-27.
- Collin S., Counet C., Callemien D. et Jerkovic V. (2006b).** Propriétés des polyphénols. In « Polyphénols et procédés ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris. pp : 46-65.
- Conde C., Silva P., Fontes N., Pires D.A.C., Tavares R.M., Sousa M.J., Agasse A., Delrot S. et Gerós H. (2007).** Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food 1: Global Science Books*, **1**: 1-22.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Uzunov D., Tubaro A., Menichini F. et Loggia R.D. (2008).** In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**: 144-151.
- Costa E., Cosme F., António M-Jordao A. et Mendes-Faia A. (2014).** Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *Journal International des Sciences de la Vigne*, **48 (1)**: 51-62.
- Counet C. et Collin S. (2003).** Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions Isolated from chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 6816-6822.
- Crupi P., Coletta A. et Antonacci D. (2010).** Analysis of carotenoids in grapes to predict norisoprenoid varietal aroma of wines from Apulia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 9647-9656.
- Da Silva S.L., Da Silva A., Honório K.M., Marangoni S., Toyama M.H. et Da Silva A.B.F. (2004).** The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure*, **684**:1-7.
- Dahmoune F., Boulekbache L., Moussi K., Aoun O., Spigno G. et Madani K. (2013).** Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops Products*, **50**: 77-87.

- Dallas C. et Laureano O. (1994).** Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and colored matter of three Portuguese grape varieties during winemaking. *Vitis*, **33**: 41-47.
- Dani C., Oliboni L.S., Vanderlinde R., Bonatto D., Salvador M. et Henriques J.A.P. (2007).** Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 2574-2580.
- Dávalos A., Fernández-Hernando C., Cerrato F., Martínez-Botas J., Gomez-Coronado D., Gomez-Cordovés C. et Lasuncion M.A. (2006).** Red Grape Juice Polyphenols Alter Cholesterol Homeostasis and Increase LDL-Receptor Activity in Human Cells In Vitro. *Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms*, **136(7)**:1766-1773.
- Dietrich H. et Pour-Nikfardjam M. S. (2009).** Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. In "Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine". Ed. Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 307-333.
- Derbel S. et Ghedira K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, **1** : 28-34.
- Diouf P.N., Stevanovic T. et Cloutier A. (2009).** Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**: 897-902.
- Dopico-García M.S., Valentao P., Jagodzinska A., Klepczynska J., Guerra L., Andrade P.B. et Seabra R.M. (2007).** Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion: Application to white grapes. *Talanta*. **74(1)**:20-31.
- Downey M.O., Dokoozlian N.K. et Krstic M.P. (2006).** Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*. **57(3)**: 257-268.
- Du B., He B.J., Shi P.B., Li F.Y., Li J. et Zhu F.M. (2012).** Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6(17)**: 3381-3387.
- Dupuch V. (1998).** Maturité phénolique et date de récolte : les apports de la méthode "CASV". Journée technique cinquantenaire ITV France. Composés phénoliques – GAILLAC (Tarn).
- Ercisli S. (2007).** Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, **104**: 1379-1384.
- Escribano-Bailón M.T. et Santos-Buegla C. (2001).** Polyphenol extraction from foods. In "Method in polyphenol analysis". Ed. Royal Society of Chemistry. pp: 1-16.
- extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, **93 (4)**: 641-649.

- Eyduran S.P., Akin M., Ercisli S., Eyduan E. et Maghradze D. (2015).** Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Iğdir province of Eastern Turkey. *Biological research*, **48** (2): 1-8.
- Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S. et Scio E. (2009).** *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects *Bioresource Technology*, **100**: 428-433.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
- Fan G., Han Y., Gu Z. et Chen D. (2008).** Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface, methodology (RSM). *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, **41**: 155-160.
- Faure H., Fayol V., Galabert C., Grolier P., Le Moël G., Steghens J.-P., Van Kappel A. et Nabet F. (1999).** Les caroténoïdes : 1. Métabolisme et physiologie. *Annales de Biologie Clinique*, **57**(2): 169-183.
- Férrandez-Lopez J.A., Almela L., Muñoz J.A., Hidalgo V. et Carreño J. (1998).** Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International*, **31**: 667-672.
- Fodil O. (1989).** Les cépages autochtones en Algérie. *Annales de l'institut agronomique El-Harrach*, **13** (3) : 235-240.
- Gaetke L.M. et Chow C.K. (2003).** Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**: 147-163.
- Gallo M., Ferracane R., Graziani G., Ritieni A. et Fogliano V. (2010).** Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, **15**: 6365-6374.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A. (2010).** Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, **15**: 8813-8826.
- Garofulic I.E., Dragovic-Uzelac V., Jambrak A.R. et Jukic M. (2013).** The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering* **117**: 437-442.
- Gary C., Brisson N., Gaudillere J.P. et Duarte M. (2003).** Modélisation d'une espèce ligneuse pérenne à fruits charnus: la Vigne. Séminaire STICS, Arles: 36-37.
- Geroyiannaki M., Komaitis M.E., Stavarakas D.E., Polysiou M., Athanasopoulos P.E. et Spanos M. (2007).** Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L). *Food Control*, **18**: 988-995.

- Ghafoor k., Park J. et Choi Y.C. (2010).** Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 485-490.
- Gonzalez-Paramas A., Esteban-Ruano S., Santos-Buelga C., Pascual-Teresa S. et Rivas-Gonzalo J. (2004).** Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **52**: 234-238.
- Gourguillon L., Destandau E., Lobstein A. et Lesellier E. (2016).** Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Comptes Rendus Chimie*, **19**: 1133-1141.
- Guelfat-Reich S. et Safran B. (1971).** Indices of Maturity for Table Grapes as Determined by Variety. *American Society for Enology and Viticulture*, **22** (1): 13-18.
- Guendez R., Kallithraka S., Makris D.P. et Kefalas P. (2005).** Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, **89**: 1-9.
- Guerrero R.F., Liazid A., Palma M., Puertas B., González-Barrio R., Gil-Izquierdo Á., García-Barroso C. et Cantos-Villar E. (2009).** Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, **112**: 949-955.
- Hagerman A.E., Riedl K.M. et Rice R.E. (1999).** Tannins as biological antioxidants. *Plant Polyphenols Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, **2**: 495- 505.
- Harborne J.B. et Williams C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**: 481-504.
- Havsteen B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96**: 67-202.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R. et Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.
- Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**: 3-6.
- Hismath I., Wan Aida W. M. et Ho C. W. (2011).** Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, **18**: 931-939.
- Hithamani G. et Ramalakshmi K. (2013).** Microwave assisted extraction of phenolics from *Origanum vulgare*. *International Journal of Agricultural and Soil Science*, **1**(1): 7-12.

- Hogan S., Zhang L., Li J., Zoecklein B. et Zhou K. (2009).** Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *Food Science and Technology*, **42**:1269-1274.
- Hollman P.C.H., Hertog M.G.L. et Katan M.B. (1996).** Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, **57(4)**: 43-46.
- Huang C-L., Liao W-C., Chan C-F. et Lai Y-C. (2010).** Optimization for the anthocyanin extraction from purple sweet potato roots, using response surface methodology. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, **59 (3)**:143-150.
- Huang D., Chen H.J., Lin C.D. et Lin Y.H. (2005).** Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **46** : 99-106.
- Huglin P. (1986).** Biologie et Ecologie de la Vigne. Ed. Payot Lausanne. Lavoisier, Paris.
- Ijaiya I.S., Arzika S. et Abdulkadir M. (2014).** Extraction and phytochemical screening of the root and leave of annona senegalesis (wild custard apple). *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*, **3(7)**: 9-15.
- Imre S.P., Kilmartin P.A, Rutan T., Mauk J.L. et Nicolau L. (2012).** Influence of soil geochemistry on the chemical and aroma profiles of Pinot noir wines. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, **10(2)**: 280-288.
- Ince A.E., Sahin S. et Sumnu G. (2014).** Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *Journal of Food Science Technology*, **51 (10)**, 2776-2782.
- Ince A.E., Şahin S. et Şumnu S.G. (2013).** Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **37**: 69-75.
- ITAF. (2011).** Guide variétale de la vigne. Ed. Tessala – El-Merdja, Boufarik, Blida, Algérie.
- Jain T., Jain V., Pandey R., Vyas A. et Shukla S.S. (2009).** Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*, **2(1)**:19-25.
- Janick J. (1992).** Horticultural Reviews. *Wiley-Interscience*. Vol. 13.
- Jara-Palacios M.J., Hernanz D., González-Manzano S., Santos-Buelga C., Escudero-Gilete M.L. et Heredia F.J. (2014).** Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta*, **125**: 51-57.
- Jerez M., Pinelo M., Sineiro J. et Nunez M. J. (2006).** Influence of extraction conditions on phenolics yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, **94**: 406-414.

- Johnson I.T. (2001).** Antioxidants and health : Antioxidants and antitumour properties . In « Antioxidants in food Practical applications ». Ed. *CRC Press LLC, North and South America*. pp: 100-119.
- Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-kojić A., Planinić M. et Srećko Tomas S. (2010).** Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from Soybeans. *Czech Journal and Food Science*, **28(3)**: 206-212.
- Jordão A.M. et Correia A.C. (2012).** Relationship between antioxidant capacity, proanthocyanidin and anthocyanin content during grape maturation of Touriga nacional and Tinta roriz grape varieties. *South African Journal for Enology and Viticulture*, **33 (2)**: 214-224.
- Jordão A.M., Ricardo-da-Silva J.M. et Laureano O. (2001).** Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, **40**: 17-22.
- Ju Z.Y. et Howard L.R. (2003).** Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 5207-5213.
- Kader A.A. (1992).** Post harvest technology of horticultural crops. Ed. Oakland, Florida.
- Katalinic V., Mozina S.S., Skroza D., Ivana Generalic I., Abramovic H., Milos M., Ljubenkovic I., Piskernik S., Pezo I., Terpinc P. et Boban M. (2010).** Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, **119**:715-723.
- Kennedy J., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E.J. et Jones G.P. (2001).** Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(11)**: 5348-55.
- Kennedy J.A. (2002).** Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard Journal*, 1-5.
- Kennedy J.A., Matthews M.A. et Waterhouse A.L. (2002).** Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53 (4)**: 268-274.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**: 165-177.
- Krishnaswamy K., Orsat V., Gariépy Y. et Thangavel K. (2012).** Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technology*, **6(2)**: 441-455.

- Kubola J. et Siriamornpun S. (2008).** Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia L.*) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, **110**: 881-890.
- Kumar R.S., Sivakumar T., Sunderam R.S., Gupta M., Mazumdar U.K., Gomathi P., ajeshwarY., Saravanan S., Kumar M.S., Muruges K. et Kumar K.A. (2005).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa L.* stem bark. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 1015-1024.
- Lafka T. I., Sinanoglou H., Evangelos S. et Lazos. (2007).** On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, **104**: 1206-1214.
- Lago-Vanzela E.S., Da-Silva R., Gomes E., García-Romero E. et Hermosín-Gutiérrez E. (2011a).** Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **59**: 13136-13146.
- Lago-Vanzela E.S., Da-Silva R., Gomes E., García-Romero E. et Hermosín-Gutiérrez E. (2011b).** Phenolic Composition of the Brazilian Seedless Table Grape Varieties BRS Clara and BRS Morena. | *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **59**: 8314-8323.
- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. et Fillastre J.P. (2004).** Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, **52** : 314-322.
- Lancster J.E., Lister C.E., Reay P.F. et Triggs C.M. (1997).** Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122** (4): 594-598.
- Lapornik B., Prošek M. et Wondra A.G. (2005).** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, **71**: 214-222.
- Lee S.K. et Kader A.A. (2000).** Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, **20**: 207-220.
- Levadoux L., Benabderrabou A. et Douaouri B. (1971).** Ampélographie Algérienne cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Ed. *Société Nationale*. Alger.
- Li B.B., Smith B. et Hossain M.M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels, solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, **48**: 182-188.
- Li H., Wang X., Li Y., Li P. et Wang H. (2009).** Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, **112**: 454-460.

- Liazid A., Barbero G.F., Azaroual L., Palma M. et Barroso C.G. (2014).** Stability of anthocyanins from red Grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-Assisted extraction conditions. *Molecules*, **19**: 21034-21043.
- Liazid A., Palma M., Brigui J. et Barroso G.C. (2007).** Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, **1140**: 29-34.
- Lim Y.Y., Lim T.T. et Tee J.J. (2007).** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. **103**:1003-1008.
- Liu J.L., Li L.Y. et He G.H. (2016).** Optimization of Microwave-Assisted Extraction Conditions for Five Major Bioactive Compounds from Flos Sophorae Immaturus (Cultivars of *Sophora japonica* L.) Using Response Surface Methodology. *Molecules*, **21**: 296-322.
- Liyana-Pathirana C. et Shahidi. (2005).** Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, **93**: 47-56.
- Lutterodt H., Slavin M., Whent M., Turner E. et Yu L.L. (2011).** Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, **30**: 30–30.
- Lutz M., Jorquera K., Cancino B., Ruby R. et Henriquez C. (2011).** Phenolics and antioxidant capacity of table grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars grown in chile. *Journal of Food Science*, **76** (7): 1088-1093.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris pp : 1-28.
- Majekodunmi S.O. (2015).** Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit Research journals*, **3(11)**: 521-527.
- Makkar H.P.S. et Becker K. (1996).** Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** (5): 1291–1295.
- Mané C., Souquet J.M., Ollé D., Verriés C., Véran F., Mazerolles G., Cheynier V. et Fulcrand H. (2007).** Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 7224-7233.
- Marcheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires Romandes.

- Marinova D., Ribarova F. et Atanassova M. (2005).** Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, **40 (3)**: 255-260.
- Marqués J.L., Della Porta G., Reverchon E., Renuncio J.A.R. et Mainar A.M. (2013).** Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *Journal of Supercritical Fluids*, **82**: 238-243.
- Márquez-García B., Fernández M.Á. et Córdoba F. (2009).** Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian South western Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, **100**: 446-451.
- Mateus N., Proença S., Rebeiro P., Machado J.M. et De Freitas V. (2001).** Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y tecnología alimentaria*, **3**: 102-110.
- Matuschek E. et Svanberg U. (2005).** The effect of fruit extracts with polyphenol oxidase (PPO) activity on the in vitro accessibility of iron in high-tannin sorghum. *Food Chemistry*, **90**: 765-771.
- Mau J.L., Tsai S.Y., Tseny Y.H. et Huang J.S. (2005).** Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, **93(4)**: 641-649.
- Mazoyer M., Aubineau M., Bermond A., Boualer J., Ney B. et Roger-Estrade J. (2002).** Larousse agricole. Ed. Mathilde Majorel assistée de Nora Schott, Thierry Olivaux, dossier « institutions et organismes » et « données économiques ».
- Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard, B. et Ewert B. (1999).** Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 4009-4017.
- Mendes-Pinto M.M. (2009).** Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483**: 236-245.
- Menvielle-Bourg F.J. (2005).** La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, **3(3)**: 118-121.
- Mićić V., Novaković D., Lepojević Ž., Jotanović M., Pejović B., Dugić P. et Petrović Z. (2011).** Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. *Contemporary Materials II*, **1**: 84-87.
- Mikeš O., Vrchotová N., Tříška J., Kyseláková M. et Šmidrkal J. (2008).** Distribution of major polyphenolic compounds in vine grapes of different cultivars growing in South Moravian vineyards. *Czech Journal of Food Sciences*, **26**: 182-189.

- Milardović S., Iveković D. et Grabarić B.S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, **68**: 175-180.
- Min-Jing L., Jing-Yan Y., Shuang Y., Lan D., Zhong-Ying L. et Han-Qi Z. (2004).** Microwave-assisted extraction of Rutin and Quercetin from *Flos Sophorae*. *Chemical Research in Chinese Universities*. **20(6)**: 703-706.
- Mizuno H., Hirano K. et Okamoto G. (2006).** Effect of anthocyanin composition in grape skin on anthocyanic vacuolar inclusion development and skin coloration. *Vitis*, **45**: 173-177.
- Mohsen S.M. et Ammar A.S.M. (2009).** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, **112**: 595-598.
- Moldovan A., Mudura E., Coldea T., Rotar A. et Pop C. (2015).** Effect of maceration conditions on chemical composition and colour characteristics of merlot wines. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, **72(1)**: 104-108.
- Morelle-Lauzanne E. (2006).** L'alimentation, le stress oxydatif : sources de lipoperoxydation, comment s'en protéger. *Phytothérapie*, **5** : 234-240.
- Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A. et O'Brien P. (2003).** Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, **34**: 243-253.
- Muñiz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G.C., Wong-Paz J.E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R. et Aguilar C.N. (2013).** Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, **20(5)**: 1149-1154.
- Muthuselvi S., Sathishkumar T., Kumaresan K. et Mohan Rajeshkumar M. (2012).** Improved inulinase activity by *Penicillium purpurogenum* grown in microwave pretreated coffee spent by orthogonal design of experiment. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, **11**: 44-50.
- Nacz M. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
- Nacz M. et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1523-1542.
- Nakajima J., Tanaka I., Seo S., Yamazaki M. et Saito K. (2004).** LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *J Biomed Biotechnol*, **5**: 241-247.
- Navarre C. (1988).** L'œnologie. Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, J-B. Baillière, Paris.
- Navarre J-P. et Navarre C. (1986).** Manuel d'œnologie. Ed. 4^{ème} J-B. Baillière, Paris.

- Ngaha Njila M.I., Mahdi E., Massoma Lembe D., Nde A. et Nyosseu D. (2017).** Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences (ACBES-2017) May 22-24, 2017 Kuala Lumpur (Malaysia)*: 67-72.
- Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D., Boelens P.G., Norren K. et Leeuwen P. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **74**: 418-425.
- Nile S.H., Kim S.H., Ko E.Y. et Se Wn Park S.W. (2013).** Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars. *BioMed Research International*, **2013**: 1-5.
- Nkhili E., Tomao V., El Hajji H., El Boustani E.S., Chemat F. et Dangles O. (2009).** Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochemical Analysis*, **20**: 408-415.
- Oancea S., Stoia M. et Coman D. (2012).** Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Engineering*, **42**: 489-495.
- OIV (2008).** Résolution VITI 1/2008. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: OIV Standard on Minimum Maturity Requirements for Table Grapes. Paris.
- OIV (2017).** Bilan de l'OIV sur la situation vitivinicole mondiale. Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.
- Oliveira C., Barbosa A., Silva Ferreira A.C., Guerra J. et De Pinho P.G. (2006).** Carotenoid profile in grapes related to aromatic compounds in wines from Douro region. *Journal of Food Science*, **71(1)**: 1-7.
- Orak H.H. (2007).** Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, **111**: 235-241.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307-315.
- Ozsoy N., Can A., Yanardag R. et Akev N. (2008).** Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, **110**: 571-583.
- Padmaja G. (1989).** Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**: 712-716.
- Pandey A. et Tripathi S. (2014).** Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2(5)**: 115-119.

Pangarkar V.G. (2008). Microdistillation, Thermomicrodistillation and Molecular Distillation Techniques. In « Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants ». Ed. International centre for science and high technology, Trieste, Italie.

Perestrelo R., Ying Lu Y., Santos S.A.O., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Câmara J.S. et Rocha S.M. (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC–DAD–ESI-MS. Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry*, **135**: 94-104.

Philpott M., Gould K.S., Lim C. et Ferguson L.R. (2004). *In situ* and *in vitro* antioxidant activity of sweet potato anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **52**: 1511-1513.

Pietta P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63** : 1035-1042.

Pincemail J., Degruene F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N. et Defraigne J.O. (2007). Effect of a diet rich in fruits and vegetables on the plasmatic antioxidant rates and of the markers of the oxidative damage. *Nutrition clinique et métabolisme*, **21**: 66-75.

Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. et Nunez M.J. (2005b). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antioxidant activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 2111-2117.

Pokorny J., Trojáková L. et Takácsová M. (2001). Practical applications : The use of natural antioxidants in food products of plant origin. In « Antioxidants in food Practical applications ». Ed. CRC Press LLC, North and South America. pp : 355-368.

Poudel P.R., Tamura H., Kataoka I. et Mochioka R., (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 622-625.

Pourali A., Afrouziyeh M. et Moghaddaszadeh-ahrabi S. (2014). Extraction of phenolic compounds and quantification of the total phenol of grape pomace. *European Journal of Experimental Biology*, **4 (1)**: 174-176.

Quan P.T., Hang T.V., Ha N.H., Nguyen Xuan De N.X. et Tuyen T.N. (2006). Microwave-assisted extraction of polyphénols from fresh Tea shoot. *Science et Technology Development*, **9(8)**: 69-75.

Rafiee Z., Jafari S.M., Alami M. et Khomeiri M. (2011). Microwave- assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **21 (4)**: 738-745.

- Ramirez-Lopez L.M., McGlynn W., Goad C.L. et Mireles DeWitt C.A. (2014).** Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. *Food Chemistry*, **149**: 15–24.
- Ranalli A., Contento S., Lucera L., Di Febo M., Marchegiani D. et Di Fonzo V. (2006).** Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 434-440.
- Ravalji N.H., Shah B.N., Modi D.C. et Lambole V.B. (2012).** Novel approach for isolation of mucilage from *Luffa actangula* fruits and screening of its binding property. *Pharma Science Monitor an International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **3 (3)**: 2199-2210.
- Razungles A., Bayonove C.L., Cordonnier R.E. et Baumes R. (1987).** Etude des caroténoïdes du raisin à la maturité. *Vitis*, **26**: 183-191.
- Rebello L.P.G., Lago-Vanzela E.S., Barcia M.T., Ramos A.M., Stringheta P.C., Da-Silva R., Noelia Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S. et Hermosín-Gutiérrez I. (2013).** Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS *Violeta* (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Food Research International*, **54**: 354-366.
- Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M. et Schieber A. (2008).** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, **110** : 620-626.
- Reynier A. (1986).** Manuel de viticulture. Ed. 4^{ème} *Tec et Doc*-Lavoisier, Paris.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P. et Sudraud P. (1975).** Sciences et techniques du vin. Tome 2, Ed. Dunod. Paris.
- Ricardo-da-Silva J.M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A. et Moutounet M. (1991).** Procyandin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **30**: 1259-1264.
- Rice-Evans C.A., Miller N. et Paganga G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20(7)**: 933-956.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. et Panganga G. (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science Reviews*, **2(4)**: 152-159.
- Riederer M. et Schreiber L. (2001).** Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 2023-2032.
- Rigaud J., Perez-Ilzarbe J., Ricardo Da Silva J.M. et Cheynier V. (1991).** Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **540**: 401-405.
- Robards K., Prenzler D.P., Tucker G., Swatsitang P. et Glover W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**: 401- 436.

- Rodrigues S., Pinto G.A.S. et Fernandes F.A.N. (2008).** Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **15**: 95-100.
- Roggero J.P., A. P. et Coen S. (1992).** Etude par CLHP des compositions phénolique et anthocyanique d'un moût de raisin en fermentation. *Sciences des Aliments*, **12**: 37-46.
- Roggero J.P., Larice J.L., Rocheville-Divorne C., Archier P. et Coen S. (1988).** Composition anthocyanique des cépages. I. Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante. *Cahiers scientifiques RFOE*, **112**: 277-284.
- Rolle L., Torchio F., Giacosa S. et Rio Segade S. (2015).** Berry density and size as factors related to the physicochemical. Characteristics of Muscat Hamburg table grapes (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, **173**: 105-113.
- Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C. et Tommasi N. (2007).** Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, **100**: 203-210.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. et Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**: 270-276.
- Sarikurkcu C., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. et Harmandar M. (2008).** Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*, **99** : 4239-4246.
- Sarradin P.M., Le Bris N., Le Gall C. et Rodier P. (2005).** Fe analysis by the ferrozine method: Adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environment. *Talanta*, **66**:1131-1138.
- Saucier C., Jerkovic V. et Collin S. (2011).** Les polyphénols du raisin. Impact des étapes de fabrication du vin. In « Polyphénols et procédés ». Ed. *Tec et Doc-Lavoisier*, Paris.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883.
- Scherer R. et Godoy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **112**: 654-658.
- Seyed M., Razavi A. et Fathi M. (2009).** Moisture-dependent physical properties of grape (*Vitis vinifera* L.) seed. *The Philippine Agricultural Scientist*, **92(2)**: 201-212.
- Sharififar F., Dehghn-Nudeh G. et Mirtajaldini M. (2009).** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, **112**: 885-888.

Sharique A. et Beigh S.H. (2009). Ascorbic acid, carotenoids, total phenolic content and antioxidant activity of various genotypes of *Brassica Oleracea encephala*. *Journal of Medical and Biological Sciences*, **3(1)**: 3-8.

Shi H., Noguchi N. et Niki E. (2001). Natural antioxidants : Introducing natural antioxidants. In « Antioxidants in food Practical applications ». Ed. *CRC Press LLC, North and South America*. pp : 147-155.

Shi J., Yu J., Pohorly J.E. et Kakuda Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, **6 (4)**: 291-299.

Singh J. (2008). Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In: « Extraction technologies for medicinal and aromatic plants ». Ed. International centre for science and high technology, Trieste, Italie.

Sivritepe N., Sivritepe H.Ö. et Türkben C. (2008). Determination of moisture content in grape seeds. *Seed Science and Technology*, **36**: 198-200.

Soler J. (1954). Les grands secteurs de l'agriculture algérienne. Ed. Le gouvernement général, revu et augmenté par les soins de l'office Algérien d'Action Économique et Touristique OFALAC.

Soto-Zamora G., Yahia E.M., Brecht J.K. et Gardea A. (2005). Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *Food Science and Technology*, **38**: 657-663.

Souquet J.M., Cheynier V. et Moutounet M. (2000). Les proanthocyanidines du raisin. *Bulletin de l'OIV*, **73** : 601-609.

Spigno G., Tramelli L. et De Faveri D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food and Engineering*, **81**: 200-208.

Statista (2017). <https://fr.statista.com/statistiques/565128/production-fruitiere-mondiale-par-variete-de-fruit/>.

Suhaj M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 531-537.

Sun B., Pedro Belchior G., Ricardo-da-Silva J.M. et Isabel Spranger M. (1999). Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *Journal of Chromatography A*, **841(1)**: 115-121.

Sun B.S., Ricardo-da-Silva J.M. et Spranger M.I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **16**: 23-34.

- Sveltana I.T. et Dorina G.A. (2013).** Flavonoid extraction from *Ficus carica* leaves using different techniques and solvents. *Journal of Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*, **125**: 79-84.
- Tachakittirungrod S., Okonogi S. et Chowwanapoonpohn S. (2007).** Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, **103**: 381-388.
- Tandon S. et Rane S. (2008).** Decoction and Hot Continuous Extraction Techniques. In « Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants». Ed. International centre for science and high technology, Trieste, Italie.
- Tapiero H., Tew K.D., Ba N.G. et Mathé G. (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*; **56**: 200-7.
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. et El-Elimat T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, **104**: 1372-1378.
- Tayeb B.M. (1990).** Le secteur viticole et vinicole en Algérie: marché interne et commerce international. *A Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and Environment*. **(1)1**: 33-36.
- Tepe B., Daferera D., Sokemen A., Sokemen M., et Polissiou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentos* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, **90**: 333-340.
- Thabit R.A.S., Cheng X.R., Tang X., Shi H.W., Shi Y.H. et Guo-Wei Le G.W. (2014).** Optimization of Extraction of Phenolic Content from *Conyza bonariensis*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **36(5)**: 895-905.
- Tomás-Barberán F.A. et Espin J.C. (2001).** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**:853-876.
- Topalović A. et Mikulić-Petkovsek M. (2010).** Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Journal of Food Agriculture and Environment*, **8 (3& 4)**: 223 - 227.
- Topalović A., Godjevac D., Perovic N. et Trifunovic S. (2012).** Comparative study of the phenolic composition of seeds from grapes cv Cardinal et Alphonse Lavalee during last month of ripening. *Italian Journal of Food Science*, **24**: 160-166.
- Topalović A., Slatnar A., Stampar F., Knezević M. et Veberic R.(2011).** Influence of Foliar Fertilization with P and K on Chemical Constituents of Grape cv. 'Cardinal'. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **59 (18)**: 10303-10310.

- Tural S. et Koca I. (2008).** Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas L.*) grown in Turkey. *Scientia Horticulturae*, **116**: 362-366.
- Umi T. et Unal M. (2005).** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, **100**: 909-913.
- Valnet J. (2001).** La santé par les fruits, les légumes et les céréales. Ed. Vigot. Paris.
- Varma N. (2016).** Phytoconstituents and their mode of extractions: An Overview. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, **4(2)**: 8-15.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. et Oomah B.D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 4113-4117.
- Vial P.M., Crisosto C.H. et Crisosto G.M. (2005).** Early harvest delays berry skin browning of "Princess" table grapes. *California Agriculture* **59 (2)**: 103-108.
- Virgili F., Scaccini C., Packer L. et Rimbach G. (2001).** Antioxidants and health: Cardiovascular disease and nutritional phenolics. In « Antioxidants in food Practical applications ». Ed. CRC Press LLC, North and South America. pp : 87-96.
- Wang B., Zhang W.W., Duan X.J. et Li X.M. (2009).** *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*, **113**: 1101-1105.
- Wang H., Gao X. D., Zhou G. C., Cai L. et Yao W. B. (2008).** In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry*, **106**: 888-895.
- Wang Y., Ying L., Sun D., Zhang S., Zhu Y. et Xu P. (2011).** Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems: Process optimization and antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**: 6856-6870.
- Wissam Z., Ghada B., Wassim A. et Warid K. (2012).** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmaceutics*, **4(3)**: **675-682**.
- Wollgast J. et Anklam E. (2000).** Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, **33**: 423-447.
- Wong-Paz J.E., Contreras-Esquivel J.C., Muniz-Marquez D., Belmares R., Rodriguez R., Flores P. et Aguilar C.N. (2014).** Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from semiarid plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, **9 (3)**: 299-310.
- Yang Y.C., Yang Z.W., Zhang Z.H., Li J., Zu Y.G. et Fu Y.J. (2013).** Effect of acidhydrolysis in the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Geranium*

sibiricum Linne with the guidance of antibacterial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, **7 (14)**: 819-830.

Yemis O., Bakkalbasi E. et Nevzat A. (2008). Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**: 154-159.

Yilmaz Y. et Toledo R.T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wineindustry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 41-48.

Zhou K. et Raffoul J.J. (2012). Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of Oncology*, **2012**: 1-8.

Zhu M., Phillipson J.D., Greengrass P.M., Bowery N.E. et Cai Y. (1997). Plant polyphenols : Biologically active compounds or non-selective binders to protein ? *Phytochemistry*, **44 (3)**: 441-447.

Annexes

Liste des annexes

Tableau : Composition chimique du raisin (Souçi *et al.*, 1994).

Constituants	Quantité en g pour 100 g de fruit
Eau	81,10
Protéines	0,68
Matières grasses	0,28
Sucres	15,24
Fibres	1,50
Acides organiques	0 ,35
Minéraux	0,48

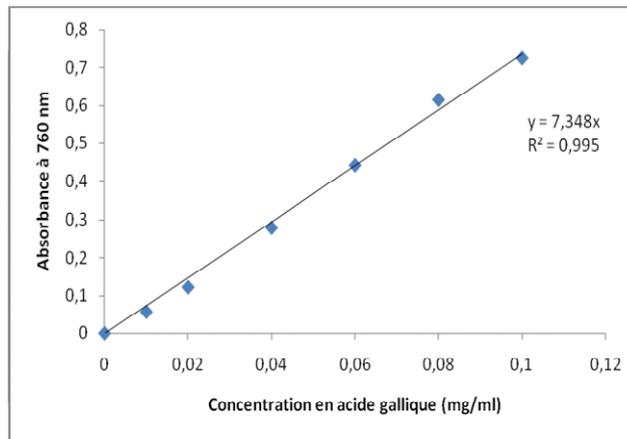


Figure 1 : Courbe étalon pour le dosage des polyphénols totaux

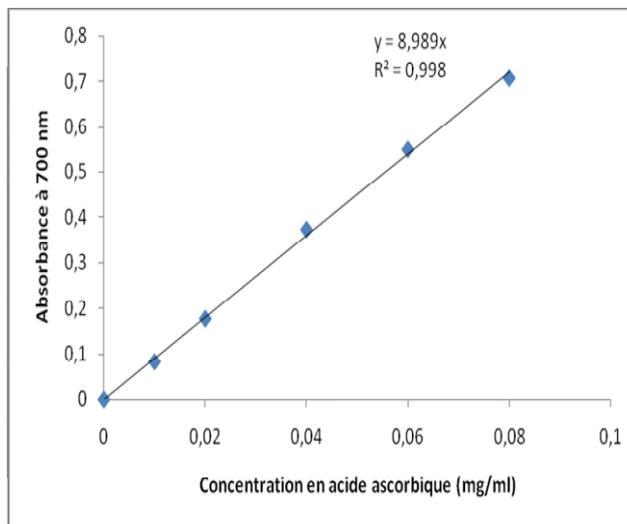


Figure 2 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur

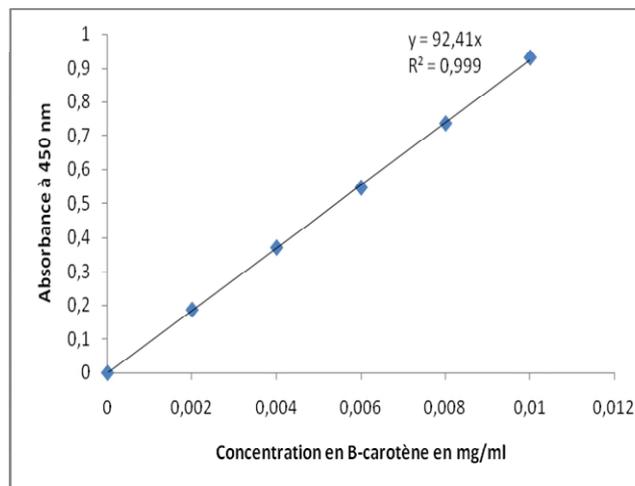


Figure 3 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes

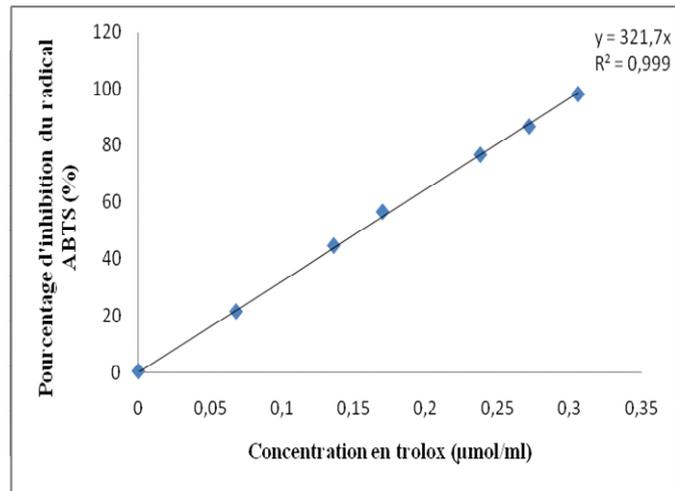


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la neutralisation du radical ABTS^{•+}

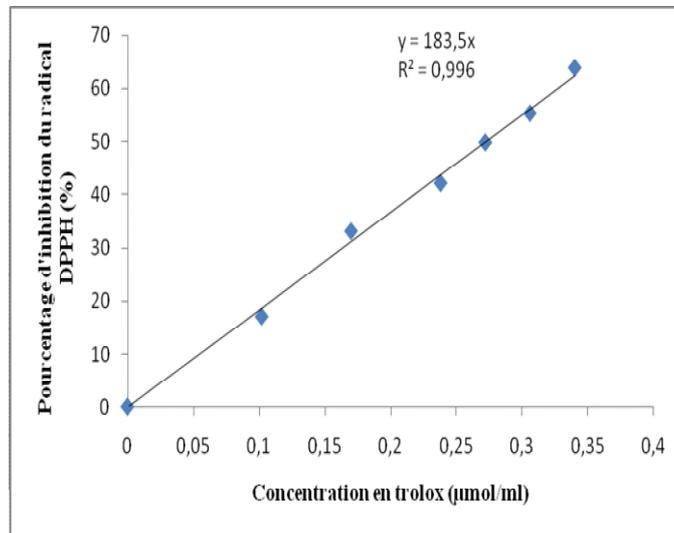
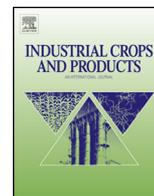


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la neutralisation du radical DPPH[•]

*Valorisation
scientifique*



Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products



Sonia Medouni-Adrar^{a,*}, Lila Boulekbache-Makhlouf^a, Yves Cadot^b,
Lamia Medouni-Haroune^c, Farid Dahmoune^a, Aida Makhoukhe^a, Khodir Madani^a

^a Laboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie, et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

^b INRA, UE 1117 Vigne Vin, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucozéd Cedex, France

^c Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2015

Received in revised form 17 August 2015

Accepted 18 August 2015

Keywords:

Grape by-products

Phenolics

Extraction methods

Optimization

Response surface methodology

ABSTRACT

Grape seeds and skin are by-products of wine making or juice making operations which are considered as a good source of bioactive compounds. In this study, the total phenolic content (TPC) from *Vitis vinifera* L. cv. *Ahmar Bou-Amar* seeds and skin was optimized by conventional solvent extraction (CSE) and microwave-assisted extraction (MAE) using response surface methodology (RSM), then a comparative study was carried out. The optimal conditions for seeds extracted by CSE were: 74.33% v/v of ethanol concentration, 65.23 min extraction time, 0.1 g/70.86 ml solid/liquid ratio, and for those extracted by MAE were: 59.88 s irradiation time and 373.15 W microwave power. The extract obtained under these conditions showed a TPC of 96.56 ± 1.29 mg GAE/g and 73.15 ± 0.20 mg GAE/g DW for CSE and MAE, respectively. Concerning skin, the optimal conditions for CSE were: 51.46% v/v of acetone concentration, 89.80 min extraction time, 0.1 g/32.25 ml solid/liquid ratio and for MAE were: 113.74 s irradiation time and 384.44 W microwave power. The extract obtained under these conditions showed a TPC of 39.57 ± 0.23 mg GAE/g and 54.84 ± 0.41 mg GAE/g DW for CSE and MAE, respectively. The TPC of seeds extract obtained with MAE was 24% lower than that of the CSE extract; also, the antioxidant activity of CSE extract is better than that of MAE extract. While, the TPC of skin extract obtained with MAE was 28% higher than that of the CSE extract and the antioxidant capacity was significantly higher than that of the CSE extract. The results indicate that the extracts of cv. *Ahmar Bou-Amar* seeds and skin contain a high quantity of polyphenols; therefore, they can be considered as a good source of natural antioxidants.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Grapes (*Vitis vinifera* L.), are the world's largest fruit crop (Ghafoor et al., 2010; Yang et al., 2009), with a total production of approximately 75.1 million tons in 2013 (O.I.V., 2015). Although, a high part of grapes is made into wine, another part is dried into raisins, a significant part is consumed as table grapes (Nelson, 1979). The cv. *Ahmar Bou-Amar* grape is originated in Algeria, it is widespread in the Kabily region with a low commercial value, and is generally consumed as a fresh fruit.

Vitis vinifera L. contains large amounts of phytochemicals such as phenolic compounds (Yang et al., 2009) which offer health benefits via their important antioxidant activity (Andjelkovic et al., 2013).

The grape polyphenolic compounds are found essentially in seeds and skins with approximately 75% (Ghafoor et al., 2010); these levels are influenced by the grape variety and environmental factors (Cadot et al., 2008; Cheynier et al., 1998; Katalinic et al., 2010).

Grape seeds and skins which are a low-value by-products of wine making or juice making operations are considered to be a cheap and a good source of the high-quality phenolic compounds (Bucić-Kojić et al., 2007; Spigno et al., 2007), so they can be exploited as natural antioxidant agents to neutralize free radicals in biological systems (Bucić-Kojić et al., 2007; Ghafoor et al., 2010).

Extraction is a critical step in the isolation of active compounds from plant material (Afoakwah et al., 2012; Dragović-Uzelac et al., 2012). Different extraction methods have been investigated in this regard; conventional extraction methods are generally based on choosing the accurate solvent in order to enhance the solubility of active compounds (Dragović-Uzelac et al., 2012; Ravalji et al.,

* Corresponding author. Fax: +213 34 21 47 62.

E-mail address: sonia.medouni@yahoo.fr (S. Medouni-Adrar).

2012). These methods necessitate longer extraction time which produces a thermal deterioration for the majority of the active compounds (Wong-Paz et al., 2014). Recently, environmental friendly techniques are being interested to develop the “Green Chemistry” concept such as ultrasound-assisted extraction (Bimakr et al., 2013) and microwave-assisted extraction (MAE) (Afoakwah et al., 2012; Rafiee et al., 2011; Wong-Paz et al., 2014; Zheng et al., 2011).

Microwave-assisted extraction is considered as a novel extraction method that combines microwave and conventional solvent extraction (Lopez-Avliá and Young, 1994). It is a technique used to extract active compounds from a range of raw materials using the energy of microwave radiation to heighten the temperature of the solvents successfully and rapidly (Afoakwah et al., 2012; Zheng et al., 2011). MAE is also able to decrease jointly the solvent consumption and extraction time in comparison to conventional techniques. Moreover, it has the possibility to improve extraction quality (Hithamani and Ramalakshmi, 2013; Ravalji et al., 2012; Wong-Paz et al., 2014).

Considering the variability of the structures of phenolic compounds present in different parts of grape (Rivera-Dominguez et al., 2010), it is important to develop an optimal extraction method for each matrix. As the extraction methods are affected by different parameters as well as the interaction of all these factors, the use of an optimization modeling is necessary to facilitate the determination of the optimum extraction conditions. Response surface methodology (RSM) is a mathematical technique which is able to generate statistical models and take into consideration the possible interrelationships between the different test parameters while reducing the number of essays and allowing for considerable reduction of operation cost and time (Dahmoune et al., 2014).

Many authors investigated Conventional Solvent Extraction procedure (CSE) of phenolic compounds and their properties from grape seeds and skins and from other plant materials (Bordiga et al., 2011; Katalinic et al., 2010; Pinelo et al., 2005a). However, limited information has been published on the use of microwave for the extraction of total phenolic compounds from grape seeds and skins. Moreover, there is a little published information about optimization modeling and comparison of CSE and MAE extraction process from grape by-products. Finally, to the best of our knowledge, no literature report exists on the extraction of polyphenols from grape cv. *Ahmar Bou-Amar*. Therefore, there is a need to develop an optimal method for the extraction of phenolic compounds from the by-products of this variety. Thus, the objectives of the current study are to: (1) optimize the phenolic compounds extraction from seeds and skin of grape *Vitis vinifera* cv. *Ahmar Bou-Amar* by CSE and MAE, studying the effects of different parameters on the extraction efficiency, using Box-Behnken Design (BBD) and Central Composite Design (CCD) of RSM. (2) Compare the optimized CSE with MAE process based on the total phenolic content (TPC) and the antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Folin–Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate (Na_2CO_3), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) and all solvents used were obtained from Prolabo (made in CE). Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), trifluoroacetic Acid ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$) and ABTS: 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-b6-sulfonic acid ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NaO}_6\text{S}_4$) were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Potassium ferricyanide ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$), ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), trichloroacetic acid, gallic acid and quercetin from Biochem-chemopharma (UK).

2.2. Biological material

The fruit samples of *Vitis vinifera* cv. *Ahmar Bou-Amar* were collected in the area of Amizour (Bejaia, Algeria). Grape seeds and skin were manually separated from the pulp and dried at 40°C in a hot air oven. The dried samples were milled with an electrical grinder, the powder was sifted by a standard sieve and just the portion with particle size $< 500 \mu\text{m}$ was used.

2.3. Effect of solvent nature

In a first stage, the effect of solvent nature was studied: four solvents were used: 50% (v/v) methanol, 50% (v/v) ethanol, 50% (v/v) acetone and water. The extraction was carried out with a CSE by fixing extraction time (30 min) and sample/solvent ratio (100 mg/10 ml) at ambient temperature, after that, each sample was centrifuged at 10 000 rpm, then filtered through Whatman N^o1 paper by Büchner funnel. The supernatant was used in order to determine total phenolic compounds (TPC).

2.4. Preparation of extracts according to the experimental design

2.4.1. CSE process

Samples were extracted using the best solvent selected in the first step. In order to predict optimal extraction conditions and to determine the best combinations of three independent parameters for CSE, namely: solvent concentration, extraction time and solid/liquid ratio, a 3^3 factorial experimental design through Box–Behnken with RSM was used on the recovery of total phenolic compounds. The different levels for each independent parameter were chosen from a series of preliminary experiments without using mathematical models. The levels of independent variables were reported in Table 1.

50 mg of seeds and 100 mg of skin powders were extracted with different volumes of appropriate solvent, different extraction times and solid/liquid ratio as showed in Table 2. After extraction, each sample was centrifuged at 10,000 rpm, then filtered through Whatman No1 paper by Büchner funnel. The extracts obtained under the optimum conditions by RSM, were concentrated under vacuum using a rotary evaporator and recuperated in 55% ethanol acidified with 0.005% of trifluoroacetic acid (TFA) and stored at 0°C .

2.4.2. MAE process

Using the best solvent, solvent concentration and sample/solvent ratio fixed at optimum conditions of CSE process, the samples were extracted with MAE, the independent parameters of extraction time and microwave power were analyzed using a central composite design to assess their effects and interactions on the extraction of phenolics compounds. A RSM was used to optimize the extraction process. The different levels for each independent parameter were chosen from a series of preliminary experiments without using mathematical models. The levels of independent variables were reported in Table 1.

The microwave apparatus used in this study is a domestic one (NN-S674MF, Samsung, Malaysia), it was modified in order to condensate the vapors generated during extraction process giving a stable extract volume. Concerning the extraction, 50 mg of seeds and 100 mg of skin powders were placed in a 250 ml volumetric flask containing the extraction solvent. The samples were extracted at different irradiation times and microwave powers (Table 2). After extraction, each sample was centrifuged at 10,000 rpm, then filtered through Whatman No1 paper by Büchner funnel. The extracts obtained under the optimum conditions by RSM, were concentrated under vacuum using a rotary evaporator and recuperated in 55% ethanol acidified with 0.005% of trifluoroacetic acid (TFA) and stored at 0°C .

Table 1
Levels of different independent variables in RSM for the optimization of extracts by CSE and MAE.

Extraction process	Independent variables	Levels					
		Seeds			Skin		
		(-1)	(0)	(+1)	(-1)	(0)	(+1)
CSE	X ₁ -solvent concentration (% v/v)	50	65	80	40	55	70
	X ₂ -time (min)	30	60	90	60	90	120
	X ₃ -ratio (mg/ml)	1	1.75	2.5	2.5	3.75	5
MAE	X ₁ -Power (W)	200	400	600	200	400	600
	X ₂ -time (S)	30	75	120	60	120	180

Table 2
Preparation conditions of extracts according to the experimental design with RMS by CSE and MAE.

Essay	CSE Factors			Essay	MAE factors	
	X ₁ -solvent concentration (% v/v)	X ₂ -time (min)	X ₃ -ratio (mg/ml)		X ₁ - time (s)	X ₂ -power (W)
1	-1	+1	0	1	0	0
2	+1	0	-1	2	0	0
3	-1	0	-1	3	-1	0
4	0	-1	-1	4	91	-1
5	0	0	0	5	+1	-1
6	-1	0	+1	6	0	+1
7	0	+1	+1	7	-1	+1
8	+1	-1	0	8	0	0
9	+1	0	+1	9	0	-1
10	0	-1	+1	10	+1	0
11	0	+1	-1	11	+1	+1
12	-1	-1	0			
13	+1	+1	0			
14	0	0	0			
15	0	0	0			

To obtain the optimum operating conditions and to explain the performance of the method, a second-order model was used according to the following equation:

$$Y = \beta_0 + S\beta_i X_i + S\beta_{ii} X_i^2 + S\beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Where Y is the predicted response (TPC mg GAE/g DW), β_0 , β_i , β_{ii} , and β_{ij} are regression coefficients for intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively and X_i and X_j are the actual levels of the independent variables.

2.5. Analysis of total phenolic compounds

Total phenolic content was measured according to the method described by Velioglu et al. (1998). 200 μ l of the extracts were mixed with 1500 μ l of Folin-Ciocalteu reagent (diluted tenfold). After 3 min, 1500 μ l of 6% sodium carbonate were added. The test tube contents were mixed and preserved for 1 h at room temperature in the dark. Then, the absorbance was measured at 765 nm versus a blank prepared without extract. Gallic acid was used as a standard and the results were expressed as milligram gallic acid equivalents per gram of dry weight (GAE/g of DW).

2.6. Evaluation of the antioxidant activity

2.6.1. ABTS⁺ method

The ABTS⁺ radical scavenging activity of extracts was determined according to the method of Awika et al. (2003). The ABTS⁺ radical was prepared by combining a volume of 8 mM ABTS⁺ with the same volume of 3 mM potassium persulfate and incubating for 16 h in the dark at room temperature. The working solution was obtained by diluting with 50% methanol to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. The results were expressed as Quercetin mg

equivalents per gram of dry weight (mg QE/g DW). The percentage inhibition was calculated according to the following formula:

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

Where A is the absorbance of the control or of the sample.

2.6.2. Ferric reducing power (FRP)

The reducing power of the extracts was evaluated using the method described by Oyaizu (1986); 1 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 1 ml of 1% potassium ferricyanide were added to 1 ml of the sample. The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. After that, 1 ml of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture and centrifuged for 10 min at 1700 g. Then 0.2 ml of 0.1% ferric chloride was added to the mixture of 1 ml of supernatant and 1 ml of distilled water. The absorbance was measured at 700 nm. Quercetin was used as a standard and reducing power was expressed as quercetin mg equivalents per gram of dry weight (mg QE/g DW).

2.7. Statistical analysis

All the essays were repeated three times and the results were expressed as means \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was done with JMP software (Version 7.0, SAS) to find the response surfaces and contour plots of the response model. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the fitting of the mathematical models was determined by evaluating the lack of fit and coefficient of determination (R^2). While the effect of type solvent on the TPC in the first stage and the results of comparison between CSE and MAE (ABTS, FRP and TPC) were statistically assessed by ANOVA using STATISTICA 5.5 to find significant differences among the different results. The statistical significance of each result was determined at 5% probability level ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Effects of the solvent on the total phenolic content

Preliminary experiments were conducted to determine optimum extraction solvent for each matrix. The efficiency of ethanol, methanol, acetone and water on the extraction of the total phenolic content from grape seeds and skin, was compared. Significant differences ($p < 0.05$) solvent extraction for skin samples as shown in Table 3, the higher content of TPC was detected in acetone extract (27.90 ± 0.39 mg GAE/g DW) followed by the ethanol, methanol and water extracts. While for seeds, the higher content of TPC was detected in ethanol extract (86.51 ± 5.36 mg GAE/g DW) followed by the methanol, water then acetone extracts. Therefore, in the following study, acetone was chosen to be the best solvent extraction for skin matrix and ethanol was chosen to be the best solvent extraction for seeds. These results are in agreement with the previous published results. Indeed, aqueous ethanol was used by several authors for the extraction of phenolic compounds from grape, grape seeds, skins and/or pomace (Bucić-Kojić et al., 2007; Carrera et al., 2012; Katalinic et al., 2010; Pourali et al., 2014; Spigno et al., 2007) and Yilmaz and Toledo (2006) have used aqueous acetone. Kennedy et al. (2002) extracted the phenolic compounds from grape skins with 66% aqueous acetone. Cadot et al. (2011, 2006) used different solvents for skins and seeds: acetone/methanol/H₂O/TFA (50:15:35:0.05) for skins and acetone/H₂O (60:40) for seeds.

3.2. Optimization of the CSE conditions

The experimental design and corresponding responses for the obtaining of grape cv. *Ahmar Bou-Amar* seeds and skin extracts are presented in Table 4. Model presented the total of 15 experiments. Three replications at the central points were included in order to evaluate experimental error measurement (Goupy and Creighton, 2006).

Following the results obtained on different solvents extraction, seeds and skins were extracted with the selected appropriate solvent (ethanol and acetone for seeds and skins respectively). The influence of the variables: solvent concentrations, solid/liquid ratio, and extraction time on the extraction of TPC was investigated through a 3³ factorial experimental design with response surface methodology (RSM) and Box–Behnken design. The experimental and predicted values of TPC at various experimental conditions are given in Table 4

As shown, TPC of seeds ranged from 87.99 to 95.97 mg GAE/g DW, while the best result was obtained when solvent concentration, extracting time and solid/solvent ratio were 65% (v/v), 60 min and 1.75 (m/v), respectively. On the other hand, TPC for skin range from 33.19 to 39.14 mg GAE /g DW, where the central point presents the best extraction conditions. The obtained results were higher than those obtained by Casazza et al. (2010). Indeed, these authors have found values of 55.98 ± 0.58 and 5.60 ± 0.20 mg GAE/g in ethanolic extracts from grape seeds and skin, respectively. Bucić-Kojić et al. (2007) found the concentration ranged from 14.72 mg GAE/g DW to 66.81 mg GAE/g DW in 50% ethanolic extract of grape seeds. Krishnaswamy et al. (2012), have obtained a value of 13.5 ± 0.48 mg GAE/g DW in 30% ethanolic extract from grape seeds.

The second order polynomial equation was generated to describe the empirical relationship between the TPC of seeds (Y_1) and skin (Y_2) and operational conditions (solvent concentration, solid/extraction time and solid/liquid ratio) in terms of coded values: the models were simplified by elimination of statistically insignificant terms.

$$Y_1 = 95.65 + 0.46X_1 + 0.35X_2 - 1.78X_3 - 0.87X_2X_3$$

$$- 0.54X_1^2 - 2.68X_2^2 - 2.41X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 38.85 - 0.43X_1 - 0.55X_2 - 1.21X_3 - 0.87X_2X_3 - 1.07X_1^2 - 1.71X_2^2 - 1.19X_3^2 \quad (4)$$

The results of the analysis of variance (ANOVA) for the adequacy of the selected mathematical models are reported in Table 5. The significance of every factor and their interactions are verified by p -values, where the values less than 0.05 indicate significance and less than 0.001 indicate high significance.

very low p -values ($p < 0.0001$ and $p = 0.0022$ for seeds and skin, respectively) indicated that each generated model was statistically significant and suggests that the CSE of grape seeds and skin could be well described with those appropriate models. The values of R -squared are close to 1 for each model ($R^2 = 0.9924$ and 0.9722 for seeds and skin, respectively), which is very high and indicates a good correlation between the experimental and the predicted values, and indicated that each model could explain 99.24% and 97.22% of the variation in the TPC in grape seeds and skin, respectively. Also, the value of F -value for the lack of fit, of both models, was not significant ($p > 0.05$), thus confirming the validity of the model. All results indicated that both models could work well for the prediction of TPC extraction from grape seeds and skin.

The regression analysis of the data showed that all the three parameters (solvent concentration (X_1), solid/liquid ratio (X_2) and extraction time (X_3)) have a significant effect ($p < 0.05$) on both seeds and skin extracts. Meanwhile, solid/liquid ratio has the dominant effect on TPC, followed by solvent concentration and extraction time. However, interactions X_1X_2 and X_1X_3 did not exhibit any significant effect in any cases. Whereas, the effects of X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 and X_3^2 on the TPC of seeds and skin extract were significant ($p < 0.05$).

The Eq. (3) shows that ethanol concentration and extraction time have significant positive linear effects on TPC grape seeds extract, whereas, solid/liquid ratio and their quadratic interaction have significant negative effects. Concerning skin, Eq. (4), indicates that all parameters and their quadratic interaction have significant negative effects on TPC. The influence of the three parameters on TPC of grape seeds and skin is depicted in Fig. 1. Results indicate that, yield of TPC increased with increasing ethanol concentration up to 74% and then it remained significantly constant. While the TPC in the grape skin extracts increased with decreasing of acetone concentration, so the maximum TPC was obtained with minimal value of acetone concentration. Similar results have been obtained by Chew et al. (2011); the 40% ethanol extract of *Centella asiatica* contained more phenolic compounds than 60%, 80% and 100% ethanol extracts. Also, Al-Farsi and Lee (2008) reported that 50% acetone was the most efficient solvent for phenolic extraction from date seeds.

From Fig. 1A to F, it can be concluded that the TPC, independently of solvent concentration and solid/liquid ratio, increased rapidly for grape seeds and slightly for skin extracts, respectively, with the increase of the extraction time from 30 to 60 and from 60 to 90 min for grape seeds and skin extracts, respectively; then slightly decreased from 65 to 90 and rapidly from 91 to 120 min for grape seeds and skin extracts, respectively. In general, the highest value of TPC was achieved at an extraction time of 65 and 90 min for seeds and skin extracts, respectively. But, after this point, the TPC was decreased. Similar results were reported in the literature (Spigno et al., 2007; Wissam et al., 2012; Yang et al., 2013). Pileo et al. (2005b) showed that the TPC of grape extracts decrease with the increase of the extraction time. This phenomenon

Table 3
Effect of solvent nature on the extraction of TPC from seeds and skin.

Solvents	TPC of seeds extracts (mg GAE/g DW)	TPC of skin extracts (mg GAE/g DW)
Water	57.56 ± 0.23 ^b	07.58 ± 0.83 ^d
Ethanol 50%	86.51 ± 5.36 ^a	20.61 ± 1.64 ^b
Methanol 50%	69.18 ± 1.41 ^b	13.09 ± 0.79 ^c
Acetone 50%	38.92 ± 0.68 ^c	27.90 ± 0.39 ^a

Results are reported as means ± S.D. Different letters in the same column refer to means statistically different according to ANOVA and Tukey's test.

Table 4
Box–Behnken design with the observed responses and predicted values of TPC referred to DW of seeds and skin using CSE.

Essay	Factors			Reponses			
	X ₁ - solvent concentration (% v/v)	X ₂ -time (min)	X ₃ - ratio (mg/ml)	Seeds TPC mg GAE /g DW		Skin TPC mg GAE /g DW	
				Experimental	predicted	Experimental	predicted
1	-1	+1	0	92.06 ± 0.84	92.00	36.06 ± 0.70	36.26
2	+1	0	-1	95.13 ± 1.63	95.31	36.89 ± 1.05	37.21
3	-1	0	-1	93.61 ± 1.36	93.64	38.11 ± 0.37	38.37
4	0	-1	-1	91.38 ± 1.29	91.13	36.95 ± 1.70	36.83
5	0	0	0	95.74 ± 1.09	95.65	39.14 ± 0.36	38.85
6	-1	0	+1	91.01 ± 0.90	90.83	35.98 ± 1.17	35.66
7	0	+1	+1	87.99 ± 0.54	88.24	33.19 ± 0.37	33.31
8	+1	-1	0	92.16 ± 0.78	92.22	36.68 ± 0.55	36.48
9	+1	0	+1	91.01 ± 0.38	90.98	35.32 ± 0.31	35.07
10	0	-1	+1	89.33 ± 1.10	89.30	35.70 ± 0.69	36.16
11	0	+1	-1	93.54 ± 1.48	93.57	37.94 ± 1.38	37.48
12	-1	-1	0	91.71 ± 0.48	91.93	36.88 ± 1.13	36.74
13	+1	+1	0	93.76 ± 0.82	93.54	34.63 ± 1.02	34.77
14	0	0	0	95.97 ± 0.67	95.65	38.83 ± 1.84	38.85
15	0	0	0	95.24 ± 0.78	95.65	38.58 ± 0.66	38.85

Table 5
Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model obtained with CSE. df. degrees of freedom.

Source	Seeds				Skin			
	Df	Sum of squares	F-value	P-value Prob > F	Df	Sum of squares	F-value	P-value Prob > F
Model	9	76.9125	72.9768	<0.0001	9	37.0018	19.4359	0.0022
X ₁ -Solvent	1	1.6718	14.2766	0.0129	1	1.5287	7.2272	0.0433
X ₂ - Time	1	0.9583	8.1834	0.0353	1	2.4088	11.3874	0.0197
X ₃ -Ratio	1	25.5628	218.2930	2.56815e-5	1	11.7540	55.5664	0.0006
X ₁ X ₂	1	0.3906	3.3360	0.1273	1	0.3791	1.7926	0.2382
X ₁ X ₃	1	0.5779	4.9356	0.0769	1	0.0788	0.3727	0.5681
X ₂ X ₃	1	3.0648	26.1724	0.0037	1	3.0548	14.4414	0.0126
X ₁ ²	1	1.1126	9.5012	0.0273	1	4.2876	20.2693	0.0063
X ₂ ²	1	26.5220	226.4838	2.34629e-5	1	10.7707	50.9180	0.0008
X ₃ ²	1	21.4407	183.0925	3.94951e-5	1	5.2694	24.9108	0.0041
Residual	5	0.5855	0.7301	0.6221	5	1.0576	3.8692	0.2122
Lack of fit	3	0.3060			3	0.9022		
Pure error	2	0.2794			2	0.1554		
Cor total	14	77.4980			14	38.0595		
		R ² = 0.9924				R ² = 0.9722		

could be explained by Fick's second law of diffusion, when the solvent saturates the extracted compound, the concentration gradient becomes null after a particular duration and the phenomenon stops (Rodrigues et al., 2008; Yang et al., 2013). However, it was found that augmentation of the extraction time prolonged exposure to oxygen and light (Wissam et al., 2012), thus, increase the chances for formation of free radicals which can be scavenged by phenolic compounds (Naczki and Shahidi, 2004). Also plant cells contain enzymes capable for altering the phenolic compounds, in particular polyphenol oxidase via reactions enzymatic browning (Tomás-Barberán and Espin, 2001), the longer extraction time may favor those reactions (García-Salas et al., 2010). Hence, an excessive extraction time was not useful to extract more phenolic antioxidants (Chaalal et al., 2012).

With regard to solid/liquid ratio, when this parameter decreases from 2.5 to 1 for seeds and from 5 to 2.5 for skin an increase on TPC was observed. Our results agree with those reported by Chaalal et al. (2012), who confirmed an increase of TPC when the solid/liquid ratio was decreased from 0.08 (0.8 g/10 ml) to 0.02 (0.2 g/10 ml). One of the probable explanation for this phenomenon is that regularly usage of larger volume of solvent could obtain larger amount of phenolic compounds (Ince et al., 2014); according to mass transfer principles, the driving force during mass transfer is the concentration gradient between the sample and the solvent, which is greatest when a small sample/solvent ratio is used (Pinelo et al., 2005b).

The obtained results show that the optimum extraction conditions for the recovery of the TPC using CSE from seeds (1) are: 74.33% v/v of ethanol concentration, 65.23 min extraction time and 0.1 g/70.86 ml solid/liquid ratio with a predicted yield of 96.23 mg

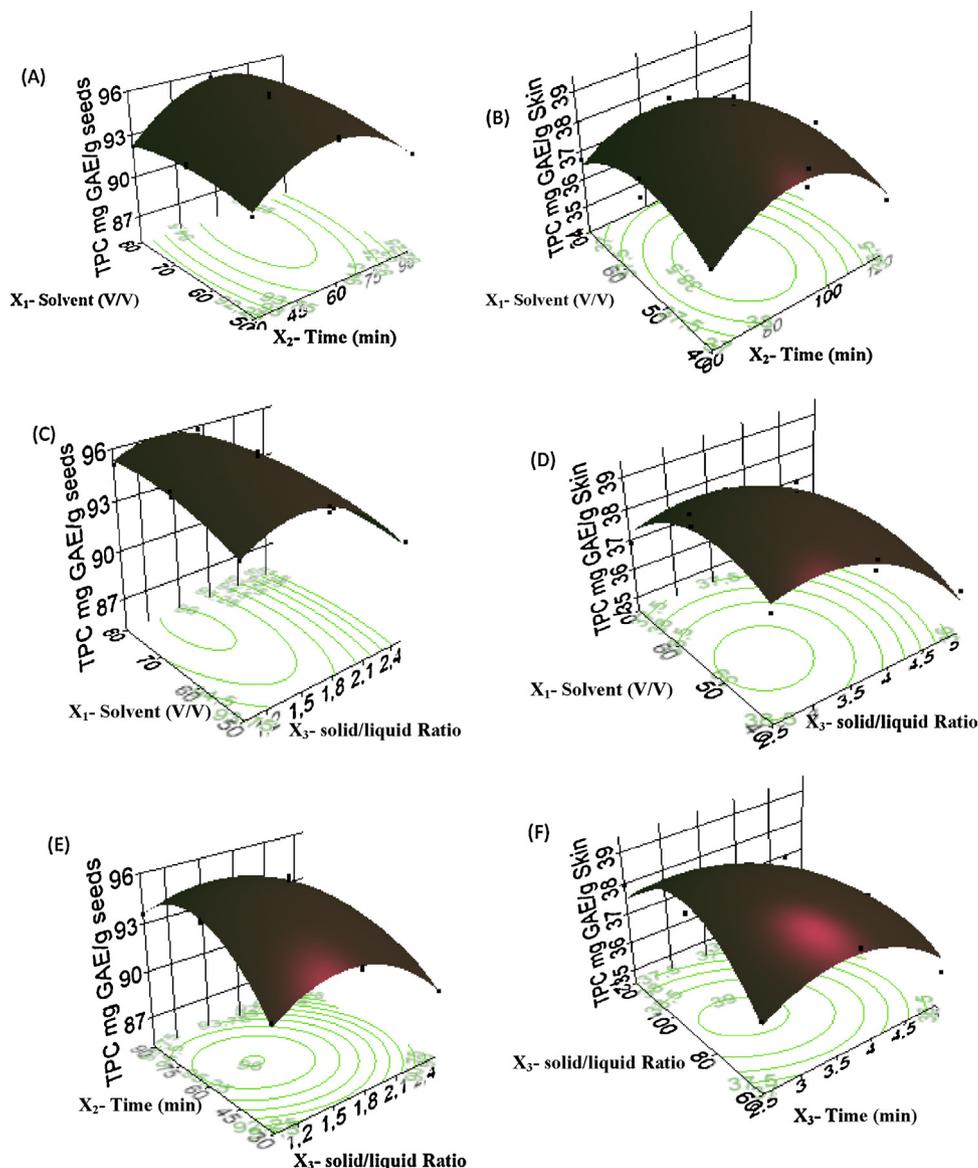


Fig. 1. Three-dimensional presentation of the developed response surface model for the TPC from grape seeds and skin with CSE with respect to extraction time and solvent percentage (A: seeds; B: skin); solid/liquid ratio and solvent percentage (C: seeds; D: skin); extraction time with solid/liquid ratio (E: seeds; F: skin).

GAE/g. A verification experiment at the optimum conditions was performed and the practical recovery of 96.56 ± 1.29 mg GAE/g was obtained. While those from the skin (2) are: at 51.46% v/v of acetone concentration, 89.80 min extraction time and 0.1 g/32.25 ml solid/liquid ratio with a predicted yield of 39.22 mg GAE/g. A verification experiment at the optimum conditions was performed and the practical recovery of 39.57 ± 0.23 mg GAE/g was obtained.

3.3. Optimization of the MAE conditions

RSM based on a Central Composite Design (CCD), through a 2^3 factorial experimental design, to optimize the Microwave-Assisted Extraction (MAE) of total phenol content from seeds and skin, was investigated. The experimental values of TPC extracts at various experimental conditions are presented in Table 6. In this new design, only the irradiation time and microwave power were studied. The solvent concentration and solid/liquid ratio were fixed at optimum that was found in CSE study. Each factor, containing three levels, was chosen from a series of preliminary experiments without using mathematical models. The model presented the total of 11

experiments. Three replications at the central points were included in order to evaluate experimental error measurement (Goupy and Creighton, 2006). The obtained results showed that the maximum TPC of the grape seeds and skin extracts were 72.92 and 55.82 mg GAE/g DW, respectively.

Eq. (5) and (6), show the relationship between irradiation time and microwave power for the extraction of total phenolic compounds of grape seeds (Y_1) and skin (Y_2), respectively.

$$Y_1 = 72.33 - 3.47X_1 - 4.98X_2 - 6.88X_1X_2 - 3.51X_1^2 - 9.22X_2^2 \quad (5)$$

$$Y_2 = 54.31 - 0.82X_1 - 0.72X_2 - 2.30X_1X_2 - 3.08X_1^2 - 3.12X_2^2 \quad (6)$$

The results of ANOVA, goodness of fit and the adequacy of the models are showed in Table 7. The ANOVA response surface quadratic regression model showed that the models were highly significant for both matrixes ($p < 0.001$) with highly F -value (129.22 and 69.87 for seeds and skin, respectively), at the same time, a high proportion of variability was explained by the RSM models for TPC as indicated by R^2 ($R^2 = 0.99$ and 0.98 for seeds and skin, respectively) therefore, the models were adequate and explained most of the variability for each matrix. Also, the lack-of fit statistics

Table 6
Central Composite Design with the observed responses and predicted values of TPC referred to DW of seeds and skin using MAE.

Essay	Factors		Reponses			
	X ₁ -time(s)	X ₂ -power (W)	Seeds TPC mg GAE/g DW		Skin TPC mg GAE/g DW	
			Experimental	predicted	Experimental	predicted
1	0	0	71.83 ± 0.79	72.32	54.92 ± 0.84	55.06
2	0	0	72.44 ± 0.46	72.32	55.82 ± 0.82	55.06
3	-1	0	72.00 ± 0.60	72.29	52.60 ± 0.98	52.79
4	-1	-1	60.68 ± 0.95	61.17	47.76 ± 0.34	47.78
5	1	-1	67.30 ± 1.08	67.97	51.28 ± 1.02	51.21
6	0	1	56.74 ± 1.23	58.12	50.58 ± 0.72	51.09
7	-1	1	65.74 ± 0.73	64.97	51.51 ± 0.64	51.3
8	0	0	72.92 ± 0.79	72.32	55.01 ± 0.52	55.06
9	0	-1	69.23 ± 1.00	68.08	52.48 ± 0.57	52.53
10	1	0	65.39 ± 1.19	65.33	50.90 ± 0.69	51.27
11	1	1	44.86 ± 1.90	44.25	45.12 ± 0.61	44.82

Table 7
Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model obtained with MAE. df. degrees of freedom.

Source	Seeds				Skin			
	df	Sum of squares	F-value	P-value Prob > F	df	Sum of squares	F-value	P-value Prob > F
Model	5	723.1177	129.2295	2.78383e-5	5	94.8697	69.9606	0.0001
X ₁ -Time	1	207.6950	72.5813	0.0004	1	4.0520	14.9408	0.0118
X ₂ -Power	1	480.6025	148.7268	8.61256e-5	1	3.1520	11.6220	0.0190
X ₁ X ₂	1	496.4884	189.1988	<0.0001	1	21.1829	78.1057	0.0003
X ₁ ²	1	85.2034	31.2173	0.0032	1	24.1343	88.9880	0.0002
X ₂ ²	1	539.8073	215.4265	3.49442e-5	1	24.6201	90.7793	0.0002
Residual	5	5.5956	5.5803	0.1557	5	1.3560	1.4520	0.4326
Lack of fit	3	4.9984			3	0.9293		
Pure error	2	0.49984			2	0.4266		
Cor total	10	728.7133			10	96.2257		
		R ² = 0.9923				R ² = 0.9859		

($p = 0.1557$ and 0.4326 for seeds and skin, respectively), which was used to test the adequacy of the model was not significant. Thus, it can be concluded that the models were well fitted and could be used to predict the TPC from grape seeds and skin extracts with MAE.

As shown in Table 7, ANOVA results indicated that effect of irradiation time (X_1) and microwave power (X_2) on TPC of seeds and skin extracts is highly significant ($p < 0.0001$) such as their interaction and their quadratic terms. According to Eq. (5) and (6) the negative coefficients for X_1 and X_2 indicate linear effects that may decrease the responses (TPC). The relationship between TPC and dependent variables is graphically presented in three dimensional response surface plots (Fig. 2). From those figures, it can be concluded that the TPC slightly increases, at a constant irradiation time, with an increase of microwave power from 200 to 380 and 410 W for seeds and skin, respectively, then rapidly decreases from 460 and 480 to 600 W for seeds and skin, respectively.

It was also observed that the increase in the irradiation time at lower microwave power, leads to the increase of the response. At lower microwave power, the impact of extraction time has a positive effect on the TPC up to the extraction time of 84 s and 146 s for seeds and skin extracts respectively, and then it has a negative impact. It is very interesting to note that the TPC (1) decreases with the increasing of the microwave power for longer extraction times and (2) increases at low microwave power with long extraction time and high power with short exposure. There is a strong interaction between these two parameters, which is based on the function shape. These results conclude that the most efficient mean to extract phenols from grape seeds and skins by MAE is the application of a moderate microwave power for a short exposure. Therefore, the longer extraction time with higher microwave power can affect the quality of the phenolic compounds. Afoakwah

et al. (2012) reported that, the extraction process of MAE is widely influenced by time exposure to heat. Thus, the quantity of target compounds extracted can be increased with an increase in the extraction time, but there is an associated risk of deterioration of thermo labile ones. The results obtained can be explained by the fact that the increase of the microwave power in short extraction time leads to the increase of the content of phenolic compounds by increasing the solubility of the target analytes, the diffusion rate, and the mass transfer (Afoakwah et al., 2012; Dahmoune et al., 2013; Garcia-Salas et al., 2010). However, it was noted that increasing the power up to a certain values may promote possible concurrent decomposition of phenolic compounds (Afoakwah et al., 2012; Muthuselvi et al., 2012). Additionally, high power may encourage solvent loss through evaporation (Garcia-Salas et al., 2010; Thabit et al., 2014).

Optimal conditions for seeds extract are: irradiation time of 58.63 s and microwave power of 373.15 W with a predicted TPC yield of 73.29 mg GAE/g DW. For skin extract: irradiation time of 113.74 s and microwave power 384.44 W with a predicted TPC yield of 54.38 mg GAE/g DW. The validity of those predicted optimal values of TPC for each matrix extracts, was also experimentally confirmed: 73.15 ± 0.20 and 54.84 ± 0.41 mg GAE/g DW for seeds and skin, respectively, very close to the values predicted by the models.

3.4. Comparison between CSE and MAE

Table 8 shows the concentrations of phenolic compounds and the antioxidant activity (ABTS radical scavenging activity and reducing power) of the extracts obtained under the best conditions. The results indicate that TPC of seeds extract obtained with MAE was significantly lower (73.15 ± 0.20 mg/g) than that obtained with CSE (96.56 ± 1.29 mg/g). The same observation is

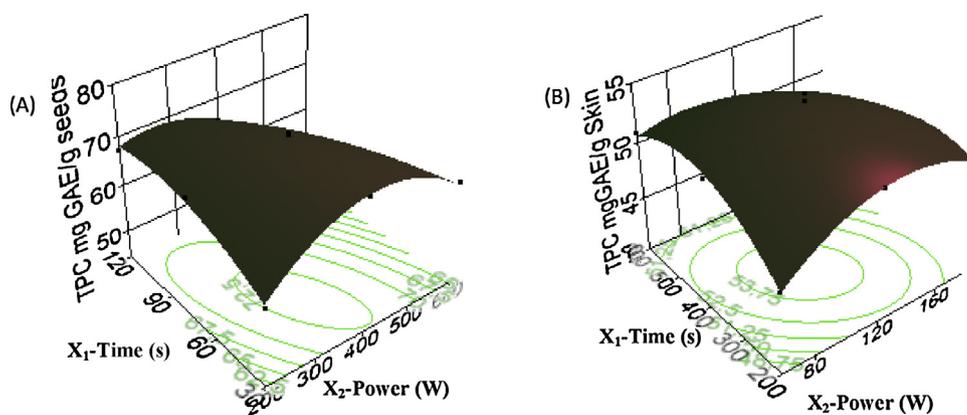


Fig. 2. Response surface model for the TPC from grape seeds and skins with MAE to irradiation time and microwave power (A: seeds; B: skin).

Table 8
Total phenolic content and antioxidant activity of different extracts.

Matrixes	TPC mg GAE/g DW		ABTS mg QE/g DW		FRP mg QE/g DW	
	CSE	MAE	CSE	MAE	CSE	MAE
Seeds	96.56 ± 1.29 ^a	73.15 ± 0.20 ^b	182.24 ± 5.44 ^a	134.62 ± 1.99 ^b	181.90 ± 1.09 ^a	122.94 ± 1.10 ^b
Skin	39.57 ± 0.23 ^b	54.84 ± 0.41 ^a	104.94 ± 0.54 ^b	108.36 ± 1.14 ^a	90.98 ± 0.94 ^b	93.52 ± 1.11 ^a

Results are reported as means ± S.D. Different letters in the same line and in two consecutive columns refer to means statistically different according to ANOVA and Tukey's test.

noted for the antioxidant activity, indeed the ABTS and the FRP values (182.24 ± 5.44 and 181.90 ± 1.09 mg EQ/g DW, respectively) of extract obtained by CSE were significantly higher than those obtained by MAE (134.62 ± 1.99 and 122.94 ± 1.10 mg EQ/g DW, respectively).

The lower TPC of seeds extracts obtained with microwave extraction as compared to conventional extraction can due to their heat sensibility. The effect of temperature cannot be generalized since it strongly depends on typology of compounds (Spigno et al., 2007).

The heat treatment causes irreversible changes in tannins structure, indeed, Padmaja (1989), has reported the decrease of tannin contents in cassava leaves dried at 60 °C. Several studies showed that extraction of tannins and proanthocyanidins, which are the major phenolic compounds in grape seeds (Bordiga et al., 2011; Cadot et al., 2006; Shi et al., 2003), decrease with the increase of temperature (Makkar and Becker, 1996; Padmaja, 1989; Spigno et al., 2007). Liazid et al., (2007) also showed that the microwave radiation can easily degrade unstable phenolics due to their structural properties. Phenolic compounds with higher number of hydroxyl substituent in their aromatic rings are unstable and can easily be degraded under high temperature conditions. The degradation of phenolic compounds can generate a decline on the antioxidant activity, which can explain the lower antioxidant activity of extracts obtained by MAE in comparison to those obtained by CSE method. Indeed, several authors found a significant correlation between TPC and antioxidant activity (Slusarczyk et al., 2009; Velioglu et al., 1998).

In the other hand, TPC of skin extracts obtained by different methods showed significant difference (Table 6). The TPC obtained by MAE method (54.84 ± 0.41) was significantly ($p < 0.05$) higher than that obtained by CSE method (39.57 ± 0.23 mg/g). The same observation is noted for the antioxidant activity. Indeed the ABTS and the FRP values (104.94 ± 0.54 and 90.98 ± 0.94 mg EQ/g DW, respectively) of extract obtained by CSE were lower than those obtained by MAE (108.36 ± 1.14 and 93.52 ± 1.11 mg EQ/g DW, respectively).

For extracting phenolic compounds, Hithamani and Ramalakshmi, (2013) and Rafiee et al. (2011) have shown that MAE was more effective than the conventional extraction methods with reducing in extraction time. The reduction of the extraction time was due to the heating mechanism of the microwaves (Rafiee et al., 2011; Yang et al., 2013). An enhance in temperature adds to the efficacy of the process, indeed heat (1) decreases the viscosity of the solvent, which makes easy its passage through the solid matrix so the efficiency of the extraction. In the other hand, it (2) increases the permeability of cell walls which promotes the solubility and the diffusion coefficients of the biological active compounds to be extracted (Afoakwah et al., 2012; Muthuselvi et al., 2012; Wissam et al., 2012); As a result, microwave in comparison to conventional extraction can extract polyphenols in shorter times (Bayramoglu et al., 2008).

The shorter extraction time in microwave processing can reduce the degradation of biological active compounds (Ince et al., 2014; Ravalji et al., 2012), which explains the result of the antioxidant activity of grape skin extracts. In fact, the lower activity of CSE extract could be a result of the extension in the extraction time; the long exposure of the extracts to unfavorable conditions such as light, together with oxygen and temperature, is the most important factor that facilitates degradation reactions (Garcia-Salas et al., 2010).

4. Conclusion

The aim of this study was, on the one hand, to obtain a better survey into optimization of extraction conditions of phenolic compounds from Algerian grape cv. *Ahmar Bou-Amar* with two extraction methods (CSE and MAE) using RSM, and on the other hand to compare those extraction methods based on the maximum TPC and antioxidant activity measured with ABTS and FRP.

The results indicated that the mathematical models used in the present investigation work well for the prediction of TPC extraction from grape cv. *Ahmar Bou-Amar* seeds and skin. Thus, the two studied extraction methods were successfully optimized by BBD and CCD of RSM. On the other hand, the TPC of seeds extract obtained

with MAE was 24% lower than that of the CSE extract; also, the antioxidant activity of CSE extract was better than that of MAE extract. While, the TPC of skin extract obtained with MAE was 28% higher than that of the CSE extract and the antioxidant capacity was significantly higher than that of the CSE extract. Therefore, (1) it can be concluded that, MAE is a good alternative for the extraction of phenolic compounds from grape skin of the studied variety, since it provides a high quantity and a high antioxidant quality compared to CSE by drastically reducing the time of the process (98%). (2) In order to maximize recovery of TPC from grape seeds of the studied variety, it is better to realize the extraction with CSE method with longer extraction time compared to MAE, but it is noteworthy to point that, MAE permits to extract in only 58.63 s about 76% of TPC which were extracted by CSE during 65.23 min.

Thus, from the point of view of industrial application, MAE can be recommended for extracting antioxidant compounds from grape cv. *Ahmar Bou-Amar* byproducts with a reduction in extraction time of about 98% compared to CSE. Additionally, for their high contents of phenolic compounds in comparison to others varieties, the extracts of grape cv. *Ahmar Bou-Amar* seeds and skin can be considered as a good source of natural antioxidants and may be exploited as natural antioxidant agents for health food as substituted antioxidant to the synthetic antioxidants with great commercial interest in the food and phyto-pharmaceutical market.

Acknowledgements

We would like to thank all members of UVV laboratory at the INRA of Angers (France) for their precious help, especially Gérard Barbeau, Marie-Hélène Bouvet and Anne Mège. As well as a special thank to Mrs Wahiba Azegagh for her providing English language help.

References

- Afoakwah, A.N., Owusu, J., Adomako, C., Teye, E., 2012. Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global J. Bio-sci Biotech.* 1 (2), 132–140.
- Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y., 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chem.* 108, 977–985.
- Andjelkovic, M., Radovanović, B., Radovanović, A., Andjelkovic, A.M., 2013. Changes in Polyphenolic content and antioxidant activity of grapes cv vranac during ripening. *Weather* 34 (2), 147–155.
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51 (23), 6657–6662.
- Bayramoglu, B., Sahin, S., Sumnu, G., 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *J. Food Eng.* 88, 535–540.
- Bimakar, M., Rahman, R.A., Saleena Taip, F., Adzahan, N.M., Islam Sarker, Z., Ganjloo, A., 2013. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. *Int. Food Res. J.* 20 (1), 331–338.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coisson, J.D., Marco Arlorio, M., 2011. Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis Vinifera* L. CV. *Food Chem.* 127, 180–187.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D., 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* 81, 236–242.
- Cadot, Y., Chevalier, M., Barbeau, G., 2011. Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *J. Sci. Food Agric.* 91 (11), 1963–1976.
- Cadot, Y., Chevalier, M., Minana-Castello, M.T., Moutounet, M., 2008. Le potentiel phénolique du cabernet franc. Ed. Conception couverture: Terre des sciences. INRA Angers, France.
- Cadot, Y., Minana-Castello, M.T., Chevalier, M., 2006. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv cabernet franc during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* 54 (24), 9206–9215.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C.G., 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Anal. Chim. Acta* 732, 100–104.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P., 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *J. Food Eng.* 100, 50–55.
- Chaalal, M., Touati, N., Louaileche, H., 2012. Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Bot. Gallica* 159 (4), 467–475.
- Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Aida, W.M., Ho, C.W., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *Int. Food Res. J.* 18, 571–578.
- Cheyrier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P., 1998. Les composés phénoliques. In: *Œnologie-Fondements scientifiques et technologiques*, Flanzly (Coord) Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 125–162.
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K., 2013. Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* 50, 77–87.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K., 2014. Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* 61, 31–40.
- Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulic, I., Jukic, M., Penic, M., Dent, M., 2012. The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol. Biotech.* 50 (3), 377–383.
- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15, 8813–8826.
- Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.H., 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *JT Innov. Food Sci. Emer. Technol.* 11, 485–490.
- Goupy, J., Creighton, L., 2006. Ordre des essais. In: *Introduction aux plans d'expériences*. 3rd Ed. Dunod, Paris, PP. 147–177.
- Hithamani, G., Ramalakshmi, K., 2013. Microwave assisted extraction of phenolics from *Origanum vulgare*. *Int. J. Agric. Soil Sci.* 1 (1), 7–12.
- Ince, A.E., Sahin, S., Sumnu, G., 2014. Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J. Food Sci. Technol.* 51 (10), 2776–2782.
- Katalinic, V., Mozina, S.S., Skroza, D., Ivana Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpin, P., Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119, 715–723.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2002. Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (4), 268–274.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., Thangavel, K., 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technol.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0800-2>.
- Liazi, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, G.C., 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* 1140, 29–34.
- Lopez-Avila, V., Young, R., 1994. Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments. *Anal. Chem.* 66 (7), 1097–1106.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1996. Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *J. Agric. Food Chem.* 44 (5), 1291–1295.
- Muthuselvi, S., Sathishkumar, T., Kumaresan, K., Mohan Rajeshkumar, M., 2012. Improved inulinase activity by *Penicillium purpurogenum* grown in microwave pretreated coffee spent by orthogonal design of experiment. *Inn. Roman. Food Biotech.* 11, 44–59.
- Naczek, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Nelson, K.E., 1979. *Harvesting and Handling California Table Grapes for Market*. Ag. Sc. UCAR Publications. University of California, Berkeley, pp. 2.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307–325.
- Padmaja, G., 1989. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. *J. Agric. Food Chem.* 37, 712–716.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M.J., Nicoli, M.C., 2005a. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* 92, 109–117.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Nunez, M.J., 2005b. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2111–2117.
- Pourali, A., Afrouzih, M., Moghaddas-zadeh-ahrabi, S., 2014. Extraction of phenolic compounds and quantification of the total phenol of grape pomace. *Eur. J. Exp. Biol.* 4 (1), 174–176.
- Rafee, Z., Jafari, S.M., Alami, M., Khomeiri, M., 2011. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* 21 (4), 738–745.
- Ravalji, N.H., Shah, B.N., Modi, D.C., Lambole, V.B., 2012. Novel approach for isolation of mucilage from *Luffa actangula* fruits and screening of its binding property. *Int. J. Pharm. Sci.* 3 (3), 2199–2210.
- Rivera-Dominguez, M., Yahia, E.M., Wlodarchak, N., Kushad, M., 2010. Identification and quantification of phenolic compounds in grapes. *Acta Hort.* 877, 1233–1240.

- Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., Fernandes, F.A.N., 2008. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 15, 95–100.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y., 2003. Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *J. Med. Food.* 6 (4), 291–299.
- Slusarczyk, S., Hajnos, M., Skalicka-Wozniak, K., Matkowski, A., 2009. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chem.* 113, 134–138.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81, 200–208.
- Thabit, R.A.S., Cheng, X.R., Tang, X., Shi, H.W., Shi, Y.H., Guo-Wei Le, G.W., 2014. Optimization of Extraction of Phenolic Content from *Conyza bonariensis*. *J. Chem. Soc. Pak.* 36 (5), 895–905.
- Tomás-Barberán, F.A., Espin, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81, 853–876.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4113–4117.
- Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., Warid, K., 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int. J. Pharm.* 4 (3), 675–682.
- Wong-Paz, J.E., Contreras-Esquivel, J.C., Muñiz-Marquez, D., Belmares, R., Rodriguez, R., Flores, P., Aguilar, C.N., 2014. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from semiarid plants. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 9 (3), 299–310.
- Yang, J., Martinson, T.E., Liu, R.H., 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of winw grapes. *Food Chem.* 116, 332–339.
- Yang, Y.C., Yang, Z.W., Zhang, Z.H., Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., 2013. Effect of acid hydrolysis in the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Geranium sibiricum* Linne with the guidance of antibacterial activity. *J. Med. Plants Res.* 7 (14), 819–830.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* 19, 41–48.
- Zheng, X., Liu, B., Lil, Zhu, X., 2011. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel. *J. Med. Plants Res.* 5 (6), 1004–1011.
- O.I.V., 2015; <http://www.oiv.int/oiv/info/frstatsro>

Résumé

La vigne est implantée partout où elle trouve le climat physique et humain propice à son développement, elle s'épanouit pleinement sur les rives de la mer méditerranée. Le raisin, le fruit de la vigne cultivée, est l'un des fruits les plus consommés au monde, qu'il soit transformé ou sous sa forme naturelle, il offre un éventail de substances qui renforcent la santé humaine. L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de deux méthodes d'extraction (extraction par macération conventionnelle : EMC et extraction assistée par microondes : EAM) sur le contenu phénolique total, les acides phénols, les flavonols, les tanins totaux et individuels ainsi que sur le pouvoir antioxydant de trois parties de la baie de raisin de six cépages cultivés à Bejaia (Algérie). L'optimisation des paramètres d'extraction de chaque méthode sont déterminés par la méthodologie de surfaces de réponses. L'étude de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des pépins, pellicule et pulpe, indique des conditions d'extraction spécifiques de la matrice utilisée. La méthode colorimétrique est réalisée en vue de déterminer la teneur en certains composants antioxydants tels que les polyphénols totaux, les caroténoïdes et l'acide ascorbique. L'activité antioxydante est évaluée par quatre tests *in vitro* : pouvoir réducteur ferrique, DPPH, ABTS ainsi que le pouvoir chélateur du fer. D'autres paramètres physico-chimiques sont aussi analysés (pH, acidité, Brix et teneur en eau). La chromatographie liquide à haute performance est utilisée pour déterminer le profil phénolique des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction étudiées. Une étude comparative entre ces deux méthodes a été effectuée. Le dosage des composés phénoliques totaux à partir des extraits obtenus avec ces deux méthodes d'extraction révèle que l'EMC a donné de meilleurs rendements en composés phénoliques totaux à partir des pépins (70,72 à 136,43 mg EAG/ g MS) ; des réductions de l'ordre de 4,16% à 33,95% sont enregistrées en utilisant l'EAM. Contrairement aux pépins, l'utilisation de la technique d'EAM révèle des rendements plus élevés en polyphénols totaux dans les pellicules et les pulpes jusqu'à 28% et 30%, respectivement avec une réduction dans le temps d'extraction jusqu'à 98%. Les polyphénols sont répartis d'une manière hétérogène dans tout le fruit. Les raisins étudiés contiennent de grandes quantités de composés phénoliques, principalement concentrés dans les pépins et les pellicules. Le contenu phénolique des raisins dépend principalement des variétés étudiées. Les pépins ne renferment que des tanins condensés avec des teneurs très importantes (24,13 ; *Muscat Blanc* à 94,99 g EC/ Kg MS; *Italia*). Quant aux pellicules, les dosages ont révélés la présence de plusieurs classes poly-phénoliques à savoir les tanins condensés (16,53 à 30,21 g EC/Kg MS), les acides phénols (218,87 à 865,64 mg/ Kg MS), les flavonols (2721,99 à 7807,73 mg/kg MS) ainsi que les anthocyanes dans le cas des variétés rouges (272,71 à 3227,24 mg EMv3G/Kg MS). Les pulpes renferment une large gamme d'acides phénols, les concentrations totales varient de 31,74 à 126,27 mg/Kg MF. Des flavonols sont également présents dans les pulpes mais avec de faibles concentrations. De même, les résultats indiquent la présence des tanins dans les pulpes. La méthode d'extraction a un impact significatif sur la composition en composés phénoliques totaux et individuels, dont la variation dépend du type de la fraction étudiée (pépins, pellicules ou pulpes) et de la nature du composé à extraire. En effet, les tanins condensés totaux des pépins sont mieux extraits par EMC que par EAM, quant à ceux de pellicules aucune différence n'a été trouvée entre les deux méthodes. Un effet positif de l'EAM sur l'extraction des tanins des pulpes a été enregistré. L'efficacité d'extraction des acides phénols individuels et totaux dépend de la thermo-sensibilité du composé en lui-même et/ou de la matrice végétale (pulpe et pellicule). Les acides phénols totaux sont mieux extraits par l'EAM, quelque soit le cépage ou la fraction (pulpes et pellicules). La technique d'extraction n'a aucun effet significatif sur les rendements d'extraction en flavonols totaux à partir des pellicules des différents cépages étudiés. Néanmoins, l'efficacité de l'extraction dépend des flavonols individuels. Des réductions dans les teneurs en anthocyanes, totales et individuelles, de l'ordre de 31% sont notées en appliquant l'EAM comparant à l'EMC. Il est à souligner que l'EAM réduit l'activité antioxydante des pépins, cette activité est en relation directe avec leur contenu en composés phénoliques totaux et en tanins condensés. La méthode d'extraction n'a pas d'effet significatif sur l'activité antioxydante des pellicules. EAM affecte positivement l'activité antioxydante des pulpes.

Mots-clés : Raisin, Extraction assistée par microondes, Extraction par macération conventionnelle, conditions d'extraction, méthodologie de surfaces de réponses, composés phénoliques, activité antioxydante.

Abstract

The grapevine is implanted wherever it found the physical and human climate conducive to its development; it blooms fully on the shores of the Mediterranean Sea. The grape, the fruit of the vine grown, is one of the most consumed fruits in the world, whether processed (wine, juice or raisins) or in its natural form (table grapes), it offers a range substances that enhance human health. The objective of this work is to study the impact of two extraction methods (conventional maceration extraction: CME and microwave assisted extraction: MAE) on the total phenolic content and various individual phenolic substances as well as on the antioxidant capacity of three parts of the grape of six local grape varieties (Bejaia, Algeria). The optimization of the extraction parameters of each method are determined by the response surface methodology. The study of the optimization of the extraction of phenolic compounds from seeds, skin and pulp, indicates specific extraction conditions of the matrix used. The colorimetric method is performed to determine the content of some antioxidant components such as polyphenol levels, carotenoids and ascorbic acid. The antioxidant activity is evaluated by four *In vitro* tests: ferric reducing power, DPPH, ABTS and the chelating power of iron. Other physicochemical parameters are also analyzed (pH, acidity, Brix and moisture). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is used to determine the phenolic profile of extracts obtained by two extraction methods. A comparative study between these two methods was carried out. The determination of total phenolic compounds from the extracts obtained with these two extraction methods reveals that CME gave better yields of total phenolic compounds from seeds (70,72 to 136,43 mg AGE/g DW) ; reductions in the range of 4.16% to 33.95% are recorded using the ASM. Unlike glitches, the use of the MAE technique reveals higher total polyphenol yields in films and pulps up to 28% and 30%, respectively with a reduction in extraction time up to 98%. %. The polyphenols are distributed in a heterogeneous manner throughout the fruit. The grapes studied contain large quantities of phenolic compounds, mainly concentrated in seeds and dandruff. The phenolic content of grapes depends mainly on the varieties studied. The pips contain only condensed tannins with very appreciable contents (24,13, *Muscat Blanc* at 94.99 g CE / Kg DW, *Italia*). As for skins, the assays revealed the presence of several polyphenolic classes, namely condensed tannins (16,53 to 30,21 g CE / kg DW), phenolic acids (218,87 to 865,64 mg / kg DW), flavonols (2721,99 to 7807,73 mg / kg DW) as well as anthocyanins in the case of red varieties (272,71 to 3227,24 mg Mv3G E/ Kg DW). The pulps contain a wide range of phenolic acids, with total concentrations ranging from 31,74 to 126,27 mg / kg FD. The presence of flavonols in the pulps is also revealed but with low concentrations. Similarly, the results indicate the presence of tannins in the pulps. The extraction method has a significant impact on the composition of total and individual phenolic compounds, the variation of which depends on the type of fraction studied (seeds, skins or pulps) and the nature of the compound to be extracted. Indeed, the total condensed tannins of the seeds are better extracted by CME than by MAE, as for those of skins no differences were found between the two methods. A positive effect of the MAE on pulp tannin extraction was recorded. The extraction efficiency of the individual and total phenol acids depends on the thermo-sensibility of the compound itself and / or the vegetable matrix (pulp and skin). The total phenol acids are better extracted by the MAE, whatever the varietal or the fraction (pulps and skins). The extraction technique has no significant effect on total flavonol extraction yields from the skins of the different grape varieties studied. Nevertheless, the efficiency of the extraction depends on the individual flavonols. It should be emphasized that MAE reduces the antioxidant activity of seeds, this activity is directly related to their content of total phenolic compounds and condensed tannins. The extraction method has no significant effect on the antioxidant activity of skins. MAE positively affects antioxidant activity of the pulp.

Keywords: Grape, Microwave Assisted Extraction, Conventional Maceration Extraction, Extraction Conditions, response surface methodology, phenolic compounds, antioxidant activity.

Résumé

La vigne est implantée partout où elle trouve le climat physique et humain propice à son développement, elle s'épanouit pleinement sur les rives de la mer méditerranéenne. Le raisin, le fruit de la vigne cultivée, est l'un des fruits les plus consommés au monde, qu'il soit transformé ou sous sa forme naturelle, il offre un éventail de substances qui renforcent la santé humaine. L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de deux méthodes d'extraction (extraction par macération conventionnelle : EMC et extraction assistée par microondes : EAM) sur le contenu phénolique total, les acides phénols, les flavonols les tanins totaux et individuels ainsi que sur le pouvoir antioxydants de trois parties de la baie de raisin de six cépages cultivés à Bejaia (Algérie). L'optimisation des paramètres d'extraction de chaque méthode sont déterminés par la méthodologie de surfaces de réponses. L'étude de l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des pépins, pellicule et pulpe, indique des conditions d'extraction spécifiques de la matrice utilisée. La méthode colorimétrique est réalisée en vue de déterminer la teneur en certains composants antioxydants tels que les polyphénols totaux, les caroténoïdes et l'acide ascorbique. L'activité antioxydante est évaluée par quatre tests *in vitro* : pouvoir réducteur ferrique, DPPH, ABTS ainsi que le pouvoir chélateur du fer. D'autres paramètres physico-chimiques sont aussi analysés (pH, acidité, Brix et teneur en eau). La chromatographie liquide à haute performance est utilisée pour déterminer le profil phénolique des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction étudiées. Une étude comparative entre ces deux méthodes a été effectuée. Le dosage des composés phénoliques totaux à partir des extraits obtenus avec ces deux méthodes d'extraction révèle que l'EMC a donné de meilleurs rendements en composés phénoliques totaux à partir des pépins (70,72 à 136,43 mg EAG/ g MS) ; des réductions de l'ordre de 4,16% à 33,95% sont enregistrées en utilisant l'EAM. Contrairement aux pépins, l'utilisation de la technique d'EAM révèle des rendements plus élevés en polyphénols totaux dans les pellicules et les pulpes jusqu'à 28% et 30%, respectivement avec une réduction dans le temps d'extraction jusqu'à 98%. Les polyphénols sont répartis d'une manière hétérogène dans tout le fruit. Les raisins étudiés contiennent de grandes quantités de composés phénoliques, principalement concentrés dans les pépins et les pellicules. Le contenu phénolique des raisins dépend principalement des variétés étudiées. Les pépins ne fermentent que des tanins condensés avec des teneurs très importantes (24,13 ; *Muscata Blanc* à 94,99 g EC/ Kg MS; *Italia*). Quant aux pellicules, les dosages ont révélés la présence de plusieurs classes poly-phénoliques à savoir les tanins condensés (16,53 à 30,21 g EC/Kg MS), les acides phénols (218,87 à 865,64 mg/ Kg MS), les flavonols (2721,99 à 7807,73 mg/kg MS) ainsi que les anthocyanes dans le cas des variétés rouges (272,71 à 3227,24 mg EMv3G/Kg MS). Les pulpes renferment une large gamme d'acides phénols, les concentrations totales varient de 31,74 à 126,27 mg/Kg MF. Des flavonols sont également présents dans les pulpes mais avec de faibles concentrations. De même, les résultats indiquent la présence des tanins dans les pulpes. La méthode d'extraction a un impact significatif sur la composition en composés phénoliques totaux et individuels, dont la variation dépend du type de la fraction étudiée (pépins, pellicules ou pulpes) et de la nature du composé à extraire. En effet, les tanins condensés totaux des pépins sont mieux extraits par EMC que par EAM, quant à ceux de pellicules aucune différences n'a été trouvée entre les deux méthodes. Un effet positif de l'EAM sur l'extraction des tanins des pulpes a été enregistré. L'efficacité d'extraction des acides phénols individuels et totaux dépend de la thermo-sensibilité du composé en lui-même et/ou de la matrice végétale (pulpe et pellicule). Les acides phénols totaux sont mieux extraits par l'EAM, quelque soit le cépage ou la fraction (pulpe et pellicule). La technique d'extraction n'a aucun effet significatif sur les rendements d'extraction en flavonols totaux à partir des pellicules des différents cépages étudiés. Néanmoins, l'efficacité de l'extraction dépend des flavonols individuels. Des réductions dans les teneurs en anthocyanes, totales et individuelles, de l'ordre de 31% sont notées en appliquant l'EAM comparant à l'EMC. Il est à souligner que l'EAM réduit l'activité antioxydante des pépins, cette activité est en relation directe avec leur contenu en composés phénoliques totaux et en tanins condensés. La méthode d'extraction n'a pas d'effet significatif sur l'activité antioxydante des pellicules. EAM affecte positivement l'activité antioxydante des pulpes.

Mots-clés : Raisin, Extraction assistée par microondes, Extraction par macération conventionnelle, conditions d'extraction, méthodologie de surfaces de réponses, composés phénoliques, activité antioxydante.

Abstract

The grapevine is implanted wherever it found the physical and human climate conducive to its development, it blooms fully on the shores of the Mediterranean Sea. The grape, the fruit of the vine grown, is one of the most consumed fruits in the world, whether processed (wine, juice or raisins) or in its natural form (table grapes), it offers a range of substances that enhance human health. The objective of this work is to study the impact of two extraction methods (conventional maceration extraction: CME and microwave assisted extraction: MAE) on the total phenolic content and various individual phenolic substances as well as on the antioxidant capacity of three parts of the grape of six local grape varieties (Bejaia, Algeria). The optimization of the extraction parameters of each method are determined by the response surface methodology. The study of the optimization of the extraction of phenolic compounds from seeds, skin and pulp, indicates specific extraction conditions of the matrix used. The colorimetric method is performed to determine the content of some antioxidant components such as polyphenol levels, carotenoids and ascorbic acid. The antioxidant activity is evaluated by four *In vitro* tests: ferric reducing power, DPPH, ABTS and the chelating power of iron. Other physicochemical parameters are also analyzed (pH, acidity, Brix and moisture). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is used to determine the phenolic profile of extracts obtained by two extraction methods. A comparative study between these two methods was carried out. The determination of total phenolic compounds from the extracts obtained with these two extraction methods reveals that CME gave better yields of total phenolic compounds from seeds (70,72 to 136,43 mg AGE/g DW) ; reductions in the range of 4.16% to 33.95% are recorded using the ASM. Unlike gliches, the use of the MAE technique reveals higher total polyphenol yields in films and pulps up to 28% and 30%, respectively with a reduction in extraction time up to 98%. The polyphenols are distributed in a heterogeneous manner throughout the fruit. The grapes studied contain large quantities of phenolic compounds, mainly concentrated in seeds and dandruff. The phenolic content of grapes depends mainly on the varieties studied. The pips contain only condensed tannins with very appreciable contents (24.13, *Muscata Blanc* at 94.99 g CE / Kg DW, *Italia*). As for skins, the assays revealed the presence of several polyphenolic classes, namely condensed tannins (16.53 to 30.21 g CE / kg DW), phenolic acids (218.87 to 865.64 mg / kg DW), flavonols (2721.99 to 7807.73 mg / kg DW) as well as anthocyanins in the case of red varieties (272.71 to 3227.24 mg Mv3G E/ Kg DW). The pulps contain a wide range of phenolic acids, with total concentrations ranging from 31.74 to 126.27 mg / kg FD. The presence of flavonols in the pulps is also revealed but with low concentrations. Similarly, the results indicate the presence of tannins in the pulps. The extraction method has a significant impact on the composition of total and individual phenolic compounds, the variation of which depends on the type of fraction studied (seeds, skins or pulps) and the nature of the compound to be extracted. Indeed, the total condensed tannins of the seeds are better extracted by CME than by MAE, as for those of skins no differences were found between the two methods. A positive effect of the MAE on pulp tannin extraction was recorded. The extraction efficiency of the individual and total phenol acids depends on the thermo-sensibility of the compound itself and / or the vegetable matrix (pulp and skin). The total phenol acids are better extracted by the MAE, whatever the variety or the fraction (pulp and skins). The extraction technique has no significant effect on total flavonol extraction yields from the skins of the different grape varieties studied. Nevertheless, the efficiency of the extraction depends on the individual flavonols. It should be emphasized that MAE reduces the antioxidant activity of seeds, this activity is directly related to their content of total phenolic compounds and condensed tannins. The extraction method has no significant effect on the antioxidant activity of skins. MAE positively affects antioxidant activity of the pulp.

Keywords: Grape, Microwave Assisted Extraction, Conventional Maceration Extraction, Extraction Conditions, response surface methodology, phenolic compounds, antioxidant activity.

ملخص

تزرع الكرمة أينما وجدت المناخ المادي والبشري المفضي إلى تميزه، وهو ينمو بشكل كامل على ضفاف البحر الأبيض المتوسط العنب، ثمرة الكرمة المزروعة، هي واحدة من أكثر الفواكه استهلاكها في العالم، سواء المصنعة أو في شكلها الطبيعي، وتقدم مجموعة من المواد التي تعزز صحة الإنسان. والهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير طريقتين إستخراج (التعدين التقليدي النقع MCE والميكروويف ساعد استخراج MAE) على المحتوى الكلي الفينول والأحماض الفينولية مركبات الفلافونول والعص الجواميع والفرة المضادة للأكسدة من ثلاثة أجزاء من التوت العنب من ستة أصناف العنب المزروعة في بجاية (الجزائر). يتم تحديد الأمثل لمعاملات الاستخلاص لكل طريقة من خلال منهجية سطح الاستجابة. وتشير دراسة الاستغلال الأمثل لاستخلاص المركبات الفينولية من النقاط والأفلام واللب إلى ظروف استخراج محددة للمصفوفة المستخدمة. يتم تنفيذ طريقة اللونية لتحديد محتوى بعض المكونات المضادة للأكسدة مثل مستويات البوليفينول والكاروتينات وحمض الاسكوربيك. يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة من قبل أربعة اختبارات في المختبر: الحد من الطاقة الحديدية، ديف، أبتس والفرة مخالب الحديد. كما يتم تحليل المعلمات الفيزيائية الكيميائية الأخرى (pH، الحموضة، بركس ومحتوى الماء). يتم استخدام اللونية السائل عالي الأداة لتحديد الملف الفينولي للمستخلصات التي تم الحصول عليها من طريقتي الاستخلاص المدروسة. وقد أجريت دراسة مقارنة بين هاتين الطريقتين. إن تحديد المركبات الفينولية الكلية من المستخلصات التي تم الحصول عليها من طريقتي الاستخراج هذه يكشف أن إمك أعطت غلاة أفضل من المركبات الفينولية الكلية من البذور (70.72 إلى 136.43 مجم إيج / غ / مس). أما بالنسبة للقليل، والمقاييس كشف وجود عدة فئات بولي الفينول وهي مكثف العصب (16.53-30.21 / ز EC / كغ MS)، والأحماض الفينولية (218.87-865.64 ملغ / كغ MS)، مركبات الفلافونول (2721.99 حتى 7807.73 ملغ / كغ MS) والانتوسيانين في حالة الأصناف الحمراء (24.13-94.99 ملغ / كغ MS) تحتوي اللب على مجموعة واسعة من الأحماض الفينولية وتتراوح التركيزات الكلية من 31.74 إلى 126.27 ملغ / كغ MF. الفلافونول موجودة أيضا في اللب ولكن مع تركيزات منخفضة. وبالمثل، تشير النتائج إلى وجود العصب في اللب. طريقة استخراج لديها تأثير كبير على تكوين في الكليسيه والفردية المركبات الفينولية، التي يعتمد على نوع الكسر درس (البذور، القشرة أو اللب) وطبيعة المجمع يتم استخراج الاختلاف. في الواقع، يتم استخراج أفضل العصب المكثف من البذور من قبل إمك من قبل إمك، كما لتلك الأفلام لا توجد اختلافات بين الطريقتين. تم تسجيل تأثير إيجابي ل لمع على استخراج التانين اللب. تعتمد كفاءة استخراج أحماض الفينول الفردية والكليية على الحساسية الحرارية للمركب نفسه و / أو المصفوفة البنيوية (اللب والقشرة). يتم استخراج أفضل الأحماض الفينولية من قبل إمك، إما كان تتوزع أو جزء (اللب والأفلام). لم تكن تقنية الاستخلاص لها تأثير منوي على غلاة استخراج الفلافونول الكلي من أفلام أصناف العنب المختلفة المدروسة. ومع ذلك، فإن كفاءة استخراج يعتمد على فلافونول الفردي. يتم ملاحظة انخفاضات في محتوى الأنثوسيانين، الكلي والفردي، من 31٪ من خلال تطبيق إيم مقارنة مع إمك. وينبغي التأكيد على أن أسم يقلل من النشاط المضاد للأكسدة من البذور، وهذا النشاط يرتبط مباشرة إلى محتواها من المركبات الفينولية الكلية والعصب المكثف. طريقة الاستخلاص ليس لها تأثير كبير على النشاط المضاد للأكسدة للقشرة. إيم يؤثر إيجابيا نشاط مضادات الأكسدة من اللب.

كلمات البحث: استخراج العنب، واستخراج بمساعدة الميكروويف، واستخراج التعقيم التقليدي، وظروف الاستخراج منهجية السطح.

