



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de

La Recherche Scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar. El Oued

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie cellulaire et moléculaire



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de master  
académique en sciences biologique

Spécialité: biochimie appliquée

**Thème**

Etude de l'activité antioxydant et antifongique de  
quelques variétés de *Vitis vinifera*

Présenté par :

M<sup>elle</sup> Ouahrani Ikram

M<sup>elle</sup> Naroura Roukaia

Soutenu le 04/06/2017

**Devant le Jury composé de:**

M <sup>elle</sup>	Zaïme Sihem	Présidente	Université d'El Oued.
M <sup>me</sup>	Bekouche Amel	Examinatrice	Université d'El Oued.
M <sup>me</sup>	Boukhari Dallel	Promotrice	Université d'El Oued

2017/2018

# Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur **M<sup>me</sup> Boukhari Dalal** qui a bien voulu diriger ce travail, pour ses conseils, sa compétence et sa gentillesse qui nous permis de bien mener ce travail.*

*Les plus sincères remerciements s'adressent à **M<sup>me</sup> Ouahida Dia** pour ses orientations, sa rigueur scientifique pour la confiance qu'elle nous a accordée durant cette étude à suivre nos travaux avec intérêt tout en nous prodiguant des conseils toujours justes et elle a su nous redonner le Courage et nous aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute.*

*Nous tenons à remercier vivement **M<sup>elle</sup> Zaime Sihem** d'avoir présidé le jury et **Mme Bekouche Amel** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également les responsables de laboratoire VTRS dans notre université et spécialement monsieur **Tliba Ali** qui a mis à notre disposition tout le matériel nécessaire et disponible pour bien mener ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à monsieur **Chouikh Atef** pour avoir participé par leurs conseils respectifs de cette recherche, Nous tenons à remercier beaucoup **M<sup>elle</sup> Jihad Channa** et **M<sup>elle</sup> Sara Amer Khither** et monsieur **Jendoubi Taher** pour leurs aides.*

*Notre reconnaissance et nos grands respects s'adressent à la source du bonheur «**nos parents**» qui nos soutenue avec patience et prouvé leur confiance. Nous leur exprime notre éternelle gratitude.*

*Enfin, un grand merci à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicace*

*la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond  
toujours pour éclairer ma route, à mon cher père je dédie ce travail et  
je lui souhaite une longue belle vie;*

*à la fleur qui rechauffe et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour  
que je me rendorme, à ma très chère mère je dédie ce travail et je lui  
souhaite une longue belle vie;*

*À ma sœur; Iness;*

*À mes frères; Ibrahim, Khaled, Illyess abdel-hak;*

*À toute ma famille pédagogique*

*À tous mes enseignants de l'université de hamma lakhder d'el-oued*

*À mes collègues de la promotion de master " biochimie appliqué"*

*À tous ma famille de près ou loin*

*À toutes mes amies*

*À tous ceux qui me connaissent*

*Je dédie ce modeste travail*

*ikram*



# *Dédicace*

*Je m'incline devant Dieu tout puissant qui m'a ouvert la  
porte du savoir et m'a aidé la franchir*

*Je dédie ce modeste travail..*

*A celle qui ma mise au monde, à la lumière de mes yeux,  
l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté  
son appui durant toutes mes années d'étude.*

*A mon cher père qui m'a appris le sens de la réussite toute au long de  
mes études, pour son sacrifice, ses conseil et ses encouragements*

*A mes chère frères Waide Et Ahmed*

*A mes chères sœurs Aicha Hadda Zohra Fatima*

*Tous Mes amis les proches de mon cœur*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire*

*Naroura Reukaia*



## ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة وللفطريات لمستخلصات الأوراق العنب *Vitis vinifera* للعينتين المقارني الأبيض (MB) وأحمر بوعمر (AB) .

قدر مردود الاستخلاص بالنقع في الميثانول/ ماء (70/30) ب 23.01% و 12.33% للعينتين (AB و MB) على التوالي. وقدر تعديلات الفينولات الكلية للعينتين باستعمال المتفاعل Folin-Ciocalteu حيث وجد  $280.86 \pm 1.25$  (AB) و  $183.05 \pm 1.66$  (MB) ملغ مكافئ لحمض الجاليك ملغ / مل من المواد الطازجة. في حين وجدت الفلافونويدات الكلية والمقدرة عن طريق كلوريد الألومنيوم عند  $55.633 \pm 0.272$  للعينة (AB) و  $0.272 \pm 55.633$  للعينة (MB) بملغ مكافئ الروتين/غ مادة طازجة. وقدر محتوى الفلافنول ب  $10.297 \pm 0.582$  للعينة (AB) و ب  $8.728 \pm 0.433$  للعينة (MB) بالملغ مكافئ كيرسيتين / ملغ من المواد الطازجة وقدرت محتويات التانينات المكثفة للعينتين AB و MB ب:  $197.57 \pm 3.31$  و  $133.066 \pm 3.41$  ملغ/مل مكافئ كاتيشين/غ مادة طازجة على التوالي.

تمت دراسة الفعالية مضادات للأكسدة باستعمال اختبارات التالية CAT و DPPH و FRAP واختبار انحلال كريات الدم الحمراء حيث أظهرت النتائج أن مستخلص العينتين (AB) و (BM) فعال ضد الجذور الحرة بسبب وجود جزيئات نشطة بيولوجيا والتي تتمثل في المواد المضادة للأكسدة.

كما اظهر كل من مستخلصي العينتين (AB) و (BM) قدرة إرجاعه اقل من قيمة حمض الأسكوربيك ( $IC_{50}=0,0142mg/ml$ ) بنسبتي ( $IC_{50}=0,05mg/ml$ ) ( $IC_{50}=0.0373mg/ml$ ) على التوالي.

من جهة أخرى تم تحديد النشاط المضاد للفطريات على ستة سلالات فطرية (*Candida albicans*، *Candida Aspergillus, fumigatus*، *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus*) باستعمال طريقة انتشار الأفراس حيث أظهرت نتائج دراستنا أن مستخلص العينة AB يمتلك قدرة قوية تثبيطيه ضد السلالات المختبرة، كما وجد أن أكثر الفطريات حساسية هي *Candida albicans* مع مساحة تثبيط  $45 \pm 2$  ملم. أما بالنسبة لمستخلص العينة (MB) فلديه نشاط مثبط منخفض ضد السلالات المختبرة.

فيما يتعلق بتحديد التراكيز الدنيا المثبطة (CMI) تم تثبيط السلالات الفطرية بالنسبة للعينة AB مع تراكيز تتراوح من 5 إلى 15 أما بالنسبة للعينة (MB) فإن التراكيز كانت تتراوح بين 20 إلى 50 ملغ / مل.

**كلمات المفتاحية :** *Vitis vinifera*، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للفطريات، أحمر بوعمر (MB)،

المقارني الأبيض (AB)، مركبات الفينول.

## Abstract

The purpose of this study is to evaluate the antioxidant and antifungal activity of leaf extracts of two varieties ahmer bouamer (AB) and white mokrani (MB) of *Vitis vinifera*. The extraction was realized by maceration. The leaves were macerated in methanol / water (70/30). Yields were 23.01%, 12.33% for AB and MB respectively. And the total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is  $280.86 \pm 1.25$  (AB) and  $183.05 \pm 1.66$  (MB) mg equivalent of gallic acid / g of fresh material. The flavonoids were evaluated by the method using aluminum chlorides  $AlCl_3$ , the content is estimated at  $85.609 \pm 0.12$  (AB) and  $55.633 \pm 0.272$  (MB) equivalent mg rutine / g of fresh material. Flavonol determination revealed levels of  $10.297 \pm 0.582$  (AB),  $8.728 \pm 0.433$  (MB) equivalent mg quercetin / g of fresh material. and the condensed tannins contents of the AB and MB plants are of the order of  $197.57 \pm 3.31$  and  $133.066 \pm 3.41$  mg E Ca / g MS respectively.

Antioxidant efficacy was evaluated using the CAT, DPPH, FRAP, a blood-hemolysis display. The results showed that this extract was effective against free radicals due to the presence of molecules biologically active and which are represented by antioxidants

Leaf extracts of both AB and MB varieties of *Vitis vinifera* showed the lowest antiradical activity compared to ascorbic acid with the highest IC<sub>50</sub> values of 0.0373 and 0.05 mg / ml, respectively.

The antifungal activity was determined on six fungal strains (*Candida albicans*, *Candida galabrata*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*) according to the disc diffusion method, the results of our study show that the extract of leaves of the AB possesses a strong inhibitory capacity against the tested strains. It has also been found that the most sensitive fungus is *Candida albicans* with an area of  $45 \pm 2$  mm. Moreover, the extract of the MB plant has low inhibitory activity against the strains tested.

Regarding the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC), the fungal strains were inhibited by extracting leaves from the AB plant with concentrations ranging from 5 to 15 mg / ml. while leaf extract from the MB plant with concentrations ranging from 20 to 50 mg / ml.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, antioxidant activity, antifungal activity, Variety ahmer bouamer (AB), Variety white mokrani (MB), phenolic compounds.

## Résumé

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante et antifongique de d'extraits de feuilles des deux variétés mokrani blanc(MB) et ahmer bouamer(AB) d'espèce *Vitis vinifera*.

Les feuilles ont été soumises à une macération dans le méthanol/eau (70/30), les rendements étaient de 23.01%, 12.33 % pour AB et MB respectivement. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de  $280.86 \pm 1.25$  (AB) et  $183.05 \pm 1.66$  (MB) mg EAG/g MS. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à  $85.609 \pm 0.12$  (AB) et  $55.633 \pm 0.272$  (MB) (mg ER/g MS).et le dosage des flavonols a révélé des teneurs de  $10.297 \pm 0.582$  (AB),  $8.728 \pm 0.433$ (MB) mg EQ /g MS. Les teneurs en tanins condensés des plantes **AB** et **MB** sont de l'ordre ( $197.57 \pm 3.31$  et  $133.066 \pm 3.41$  mgECa/gMS) respectivement.

L'efficacité antioxydante a été évaluée en utilisant des tests de CAT, DPPH, FRAP et l'hémolyse, les résultats ont montré que les extraits sont efficaces contre les radicaux libres en raison de la présence de molécules biologiquement actives et qui sont représentées par des antioxydants.

Les extraits de feuilles des deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera* ont montré les activités antiradicalaires les plus faibles que l'acide ascorbique en notant les  $IC_{50}$  les plus fortes de l'ordre de 0.0373 et 0.05 mg/ml respectivement.

L'activité antifongique a été déterminée sur six souches fongiques (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* ) selon la méthode de diffusion des disques, les résultats de notre étude montrent que l'extrait de feuilles de la plante **AB** possède une forte capacité inhibitrice contre les souches testés, on a trouvé aussi que le champignon le plus sensible est *Candida albicans* avec une zone de  $45 \pm 2$ mm. Par ailleurs l'extrait de la plante MB qui possède une faible activité inhibitrice contre les souches testées.

En ce qui concerne la détermination des concentrations minimales inhibitrices, les souches fongiques ont été inhibées sous l'action d'extrait des feuilles de la plante AB avec des concentrations variant de 5 à 15 mg/ml. Alors que l'extrait des feuilles de la plante MB avec des concentrations variant de 20 à 50 mg/ml.

**Mots clés** : *Vitis vinifera*, L'activité antioxydante, L'activité antifongique, variété mokrani blanc(MB), variété ahmer bouamer (AB), Les composés phénoliques.

# ***SOMMAIRE***

**SOMMAIRE**

<i>Dédicaces</i>	
<i>Remerciements</i>	
<i>Résumés</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Introduction</i>	
<b><i>Partie 01 : synthèse bibliographique</i></b>	
<b>Chapitre I : Généralités sur les métabolites secondaires</b>	
<b><i>I. Généralités sur les métabolites secondaires</i></b>	05
<b><i>I.1 définitions des métabolites secondaires</i></b>	05
<b><i>I.2. Classement des métabolites secondaires</i></b>	05
<b><i>I.2. 1 .Les composés phénoliques</i></b>	05
<b><i>I.2.2 .Flavonoïdes</i></b>	07
<b><i>I.2. 3.Tanins</i></b>	08
<b><i>A-Tanins hydrolysables</i></b>	09
<b><i>b-Tanins condensés (Anthocyanidines)</i></b>	09
<b><i>I.2. 4.Terpenoïdes</i></b>	10
<b><i>I.2. 5.Alcaloïdes</i></b>	11
<b><i>I. 3.Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires</i></b>	11
<b>Chapitre II: Généralités sur les activités biologiques</b>	
<b><i>II. Généralités sur les activités biologiques</i></b>	13
<b><i>II. 1. Les activités biologiques des extraits</i></b>	13
<b><i>II. 1. 1. Activité anti oxydante</i></b>	13
<b><i>a. les radicaux primaires (radical)</i></b>	14

<i>b. les radicaux libres secondaires (non radicalaire)</i>	14
<b>II.1.1.3. Les antioxydants</b>	15
<b>1. Définition</b>	15
<b>2. Classification des antioxydants</b>	16
<b>3. Utilisation des antioxydants</b>	16
<b>4. Systèmes de défenses antioxydants</b>	18
<b>4.1. système antioxydant endogène</b>	18
<b>4.2 système antioxydant exogène</b>	18
<b>5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante</b>	18
<b>6. Effet des antioxydants sur la santé humaine</b>	19
<b>II. 1. 2 Activité antifongique</b>	20
<b>II. 1. 2 .1 Généralités sur les champignons</b>	20
<b>II. 1. 2 .2 Les souches fongiques utilisées dans les tests anti fongiques</b>	21
<b>II. 1. 2 .3 Description des espèces sélectionnées</b>	22
<b>II. 1. 2 .4 Les principales substances antifongiques</b>	25
<b>II. 1. 2 .4.1 Les anti fongiques</b>	25
<b>II. 1. 2 .4.2 Les composés phénoliques</b>	25
<b>Chapitre III: Généralités sur la plante étudiée (Vitis viniféra)</b>	
<b>III: Généralités sur la plante étudiée (Vitis viniféra)</b>	27
<b>III.1. Généralités de la vigne</b>	27
<b>III.2. Systématique de la vigne</b>	28
<b>III .3. Présentation l'espèce étudiée (Vitis viniféra)</b>	29
<b>III.3.1. Caractéristique botanique de l'espèce (Vitis viniféra)</b>	29
<b>III.3.2. Classification scientifique de l'espèce (Vitis viniféra)</b>	29
<b>III.3.3. Description botanique de l'espèce (Vitis viniféra)</b>	30
<b>III.3.3.4. Les principaux constituants chimiques de la Vitis viniféra.</b>	32
<b>III.3.3.5. usage thérapeutique</b>	33

<b>partie 02 : la partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre I : Matériels et méthodes</b>	
<b>I. Matériels et méthodes</b>	37
<b>I.1. Matériels</b>	37
<b>I.1.1. Matériels biologiques</b>	37
<b>I.1.1.1. Matériels végétaux</b>	38
<b>I.1.1.2. Matériels vivant biologique</b>	39
<b>I.1.2. Matériels technique d'étude au laboratoire.</b>	39
<b>I.1.2.1. Les produits et réactifs</b>	39
<b>I.1.2.2. Appareillages</b>	39
<b>I. 2. Méthodes</b>	39
<b>I.2.1. Préparation du matériel végétale</b>	40
<b>I.2.2. Méthodes d'analyse</b>	40
<b>I.2.2.1. Extraction des composés phénoliques</b>	41
<b>I.2.2.1.2. Rendement d'extraction des composés phénoliques</b>	42
<b>I.2.3. Analyses qualitative</b>	42
<b>I.2.3.1. Screening phytochimique</b>	43
<b>I.2.3.2. Analyse par chromatographie H.P.L.C</b>	43
<b>I.2.4.1. Analyses quantitative</b>	44
<b>I.2.4.1. Dosages des composés phénoliques</b>	44
<b>I.2.4.1.2. Dosage des flavanols totaux (FLT)</b>	45
<b>I.2.4.1.3. Dosage des flavanols totaux (FLT)</b>	45
<b>I.2.4.1.4. Dosage des tanins condensés (TC)</b>	45
<b>I.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante</b>	46
<b>I.2.5.1. Activité antioxydante totale (TAC)</b>	46
<b>I.2.5.2. Piégeage du radical libre DPPH</b>	47

<i>I.2.5.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)</i>	48
<i>I.2.5.4. Application du test biologique (test hémolyse)</i>	50
<i>I.2.6. L'évaluation de l'activité antifongique</i>	50
<i>I.2.6.1. Test identification des souches fongiques</i>	50
<i>I.2.6.2. Méthode de diffusion sur milieu gélosé (l'antifongigramme)</i>	51
<i>I.2.6.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI).</i>	54
<i>Analyses statistiques</i>	57
<b>Chapitre II. Résultats et discussions</b>	
<i>II.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques</i>	59
<i>II.2. Tests phytochimiques</i>	59
<i>II.3. L'Analyse par HPLC des composés phénoliques</i>	60
<i>II.3.1. Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de la variété MB</i>	61
<i>II.3.2. Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de la variété AB</i>	61
<i>II.4. Analyse quantitative des composés phénoliques par méthode colorimétrique</i>	64
<i>II.4.1. Teneur en polyphénols totaux(PPT)</i>	64
<i>II.4.2. Teneur en flavonoïdes totaux (FVT)</i>	64
<i>II.4.3. Teneurs en flavonols totaux(FLT)</i>	65
<i>II.4.4. teneurs des tanins condensés (TC)</i>	65
<i>I.5. Discussion</i>	66
<i>II.6. Evaluation de l'activité antioxydante</i>	67
<i>II.6.1. La capacité antioxydante totale (CAT)</i>	67
<i>II.6.2. Piégeage du radical libre DPPH</i>	68
<i>II.6.3. FRAP</i>	70
<i>II.6.4. Test hémolyse</i>	71
<i>II.7. Evaluation l'activité antifongique</i>	74
<i>II.7 .1. Test identification des souches fongiques</i>	75

<b>II.7. 2. Les résultats de l'antifongogramme.</b>	75
<b>II.7.3. Comparaison de l'activité de l'antifongique de référence (flucazole<sup>®</sup>) avec les extraits des plantes <b>AB</b> et <b>MB</b>:</b>	76
<b>II.7.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)</b>	82
<b>II.7.4.1. Détermination (CMI) sur milieu liquide par méthode du microdilution</b>	
<b>II.7.4.2. Détermination (CMI) par méthode de contact direct en milieu solide</b>	82
<b>II.8. Discussion</b>	83
<b>Conclusion générale</b>	86
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé et mots-clés</b>	

# **LISTE DES TABLEAUX**

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	<i>Classification des composés phénoliques</i>	06
<b>2</b>	<i>Principales espèces oxydantes</i>	15
<b>3</b>	<i>Les différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale</i>	19
<b>4</b>	<i>Classification de genre Candida</i>	22
<b>5</b>	<i>Classification de genre Aspergillus</i>	22
<b>6</b>	<i>Description Les espèces sélectionnées</i>	23
<b>7</b>	<i>Classification scientifique de Vitis vinifera</i>	29
<b>8</b>	<i>Description botanique de la vigne</i>	30
<b>9</b>	<i>Constituants chimiques principaux de Vitis vinifera</i>	32
<b>10</b>	<i>Caractéristiques des échantillons analysés</i>	37
<b>11</b>	<i>Espèces des souches fongiques testées.</i>	38
<b>12</b>	<i>Rendements des extrait de feuilles des deux variétés <b>AB</b> et <b>MB</b> exprimé(%).</i>	59
<b>13</b>	<i>Les résultats des tests phytochimiques les feuilles de deux variétés de Vitis vinifera.</i>	60
<b>14</b>	<i>Aspect microscopique des aspergillus au bleu de méthylène, obj x 100 [Photos du service de parasitologie mycologie, laboratoire El-madjed – El-oued.</i>	75
<b>15</b>	<i>Examen microscopique de; Candida glabrata, Candida albicans et Candida tropicalis après le test de blastèse (<b>Grossissement x100</b>).</i>	75
<b>16</b>	<i>Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la plante <b>AB</b> vis-à-vis des souches fongiques</i>	77
<b>17</b>	<i>Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la plante <b>MB</b> vis-à-vis des souches fongiques</i>	78
<b>18</b>	<i>Activité antifongique d'extrait de feuilles de la plante <b>AB</b> sur les espèces de Candida .sp testées.</i>	82
<b>19</b>	<i>Activité antifongique d'extrait de feuilles de la plante <b>MB</b> sur les espèces de Candida .sp testées</i>	83
<b>20</b>	<i>Effet inhibiteur des différents types l'extrait de la plante <b>AB</b> sur la croissance</i>	84

# **LISTE DES FIGURES**

**Liste des Figures**

<b>Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	<i>Squelette de base des polyphénols</i>	06
2	<i>Squelette de base des flavonoïdes</i>	07
3	<i>Structures des squelettes de base des flavonoïdes</i>	08
4	<i>Structure générale de tanins hydrolysable</i>	09
5	<i>Structure générale de tanins condensés</i>	10
6	<i>Structure de base de l'isoprène</i>	10
7	<i>Déséquilibre Antioxydant /Oxydant</i>	13
8	<i>Classification des antioxydants</i>	16
9	<i>les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques</i>	17
10	<i>La plante de la vigne</i>	27
11	<i>Systématique des vignes</i>	28
12	<i>Les racines de la vigne</i>	30
13	<i>le tronc de la vigne</i>	30
14	<i>La fleur de la vigne</i>	30
15	<i>Rameau de la vigne</i>	31
16	<i>La feuille de la vigne</i>	31
17	<i>Le raisin de la vigne</i>	32
18	<i>Situation géographique d'El oued.</i>	38
19	<i>Poudre des feuilles des deux variétés AB et MB d'espèce Vitis viniféra.</i>	40
20	<i>Protocole de préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de Vitis viniféra par macération</i>	41
21	<i>Mécanisme d'action de DPPH</i>	47
22	<i>Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).</i>	48
23	<i>Identification les moisissures par observation microscopique.</i>	51
24	<i>Méthode de diffusion sur milieu gélosé.</i>	51
25	<i>Les étapes de méthode de diffusion sur milieu gélosé.</i>	53
26	<i>La cellule de malassez</i>	54
27	<i>Méthode de préparation de la gamme décroissante d'extraits des feuilles de Vitis viniféra pour déterminer la CMI en milieu liquide.</i>	56

## LISTE DES FIGURES

<b>28</b>	<i>Profil chromatographique <b>HPLC</b> d'extrait des feuilles de la variété <b>MB</b>.</i>	<b>61</b>
<b>29</b>	<i>Profil chromatographique <b>HPLC</b> d'extrait des feuilles de la variété <b>AB</b></i>	<b>61</b>
<b>30</b>	<i>Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique pour le dosage des polyphénols totaux (<b>PPT</b>).</i>	<b>63</b>
<b>31</b>	<i>Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des phénols totaux.</i>	<b>63</b>
<b>32</b>	<i>Courbe d'étalonnage de rutine pour le dosage des flavanols totaux (<b>FLT</b>)</i>	<b>63</b>
<b>33</b>	<i>Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des tanins condensés (<b>TC</b>).</i>	<b>63</b>
<b>34</b>	<i>Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des deux plantes <b>AB</b> et <b>MB</b>.</i>	<b>64</b>
<b>35</b>	<i>Courbe d'étalonnage d'acide gallique de test <b>CAT</b>.</i>	<b>67</b>
<b>36</b>	<i>Variation de capacité antioxydante total des deux plantes <b>AB</b> et <b>MB</b>.</i>	<b>67</b>
<b>37</b>	<i>Pourcentages d'inhibition du <b>DPPH</b> en fonction des concentrations des différents</i>	<b>68</b>
<b>38</b>	<i>Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC 50 des différents extraits et d'acide Ascorbique en mg/ML.</i>	<b>69</b>
<b>39</b>	<i>Courbe d'étalonnage de FeSO<sub>4</sub> pour le test de <b>FRAP</b></i>	<b>70</b>
<b>40</b>	<i>Pouvoir réducteur des extraits <b>AB</b> et <b>MB</b> d'espèce <i>Vitis vinifera</i></i>	<b>71</b>
<b>41</b>	<i>Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique dans le teste hémolyse</i>	<b>72</b>
<b>42</b>	<i>Courbe des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse globules rouge en termes de concentrations d'extrait <b>AB</b></i>	<b>72</b>
<b>43</b>	<i>Courbe des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse globules rouge en termes de concentrations d'extrait <b>MB</b></i>	<b>72</b>
<b>44</b>	<i>Variation de pourcentage d'inhibition du test hémolyse</i>	<b>73</b>
<b>45</b>	<i>Activité de l'antifongique de référence flucazole<sup>®</sup> sur les souches fongiques</i>	<b>76</b>
<b>46</b>	<i>Comparaison de l'activité de l'antifongique de références (flucazole<sup>®</sup>) et les extraits des plantes <b>AB</b> et <b>BM</b> contre les souches testés</i>	<b>79</b>

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Da** :Dalton

**C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>** : unités de base d'isoprènes

**UV** : Ultra – violet - visible

**EOA**: espèces oxygénées activées

**2O<sup>•-</sup>** : l'anion superoxyde

**OH<sup>•</sup>** : radical hydroxyle

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

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

**ONOO<sup>-</sup>** : peroxydinitrite

**L(R)OO<sup>•</sup>** : Peroxyl

**HOO<sup>•</sup>** : Hydroperoxyl

**OCL**: Hypochlorite

**L(R)OOH** : Hydroperoxideb

**L(R)O** : Alkoxy

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Hydrogène peroxide

**<sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub>** : Singlet oxygène

**ERO** : Espèces Réactive Oxygénées

**OPU** : office des publication Universitaire

**TAC** : Activité antioxydante totale

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil

**FRAP** : Ferricion reducing antioxidant power

**H%.** : Test d'hémolyse

**H** : Heure

**mm** : millimeter

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

---

**min** : minute

**V/V** : volume/ volume

**M/V**: Masse/ volume

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**MB** : Mokrani blanc

**AB** : Ahmer bouamer

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichloride d'aluminium

**MSO** : Diméthyle sulfoxyde

**TPTZ**: Tri pyridyl tria zine

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée

**HCL** : Chlorure d'hydrogène

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure Ferrique

**C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>** : Quercétine d'hydraté

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide Sulfurique

**M<sub>08</sub>O<sub>23</sub>** : Molybdène

**VTRS** : Valorisation et technologie des Ressources Sahariennes

**PPT** : phénoliques: polyphénols totaux

**FVT** : flavonoïdes totaux

**FLT**: flavanols totaux

**TC** : tannins condensés

**mg ER/g MS**: équivalent rutine/ gr de matière sèche

**I%** : pourcentage d'inhibition

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

---

**IC50** concentration inhibitrice à 50%

**ABS** <sub>contrôle</sub>: Absorbance de milieu réactionnelle en présence de l'extrait.

**ABS** <sub>echantillon</sub>: Absorbance de milieu réactionnelle en absence de l'extrait

**Dk**: Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm).

**D0** : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm).

**T** : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

**CFU / ml**

**TH** :Tanins hydrolysable

**TC** : Tanins condensé

# **INTRODUCTION**

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: malaria, première cause de mortalité dans le monde, Cancer, Alzheimer, Leishmaniose, infections virales et bactériennes. À ceci, s'ajoute l'augmentation de l'incidence des infections fongiques avec l'émergence de nouvelles maladies qui affaiblissent le système immunitaire (SIDA) **(Beloued, 2010)**.

Les traitements antinéoplasiques de plus en plus agressifs, ainsi que l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistante aux traitements connus. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux **(Bruneton, 1999)**.

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne principalement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. **(Majinda et al., 2001)**.

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux "lead compounds", si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires **(Hostettmann, 2002)**. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires, antimicrobien **(Bahorun, 1997)**.

Dans l'axe de recherche et de valorisation des substances médicinales nous avons choisi d'étudier le pouvoir antifongique et antioxydant des extraits de deux variétés d'espèce de *Vitis vinifera*.

Notre travail est subdivisé en trois grandes parties:

- ↳ la première partie concernant la synthèse bibliographique qui englobe et rassemble des données théoriques sur la plante d'espèce de *Vitis vinifera*, et les substances bioactives de la plante étudiée et l'activité antifongique et antioxydante.
- ↳ la deuxième partie rassemble les matériels et les méthodes utilisées pour réaliser nos expériences.
- ↳ La troisième partie est consacrée pour les résultats obtenus et leurs discussions et on termine par une conclusion.

**Partie 01:**

---

**Synthèse  
bibliographique**

# **CHAPITRE I**

**Généralités sur les métabolites secondaires**

## I. Généralités sur les métabolites secondaires

### I.1 définitions les métabolites secondaires

Ils sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (Lutge et *al.*, 2002; Abderrazak et Joël, 2007). Exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température...etc) (Raven et *al.*, 2000) .

### I.2. Classement des métabolites secondaire

Les métabolites secondaires ils sont divisés principalement en trois grandes familles :

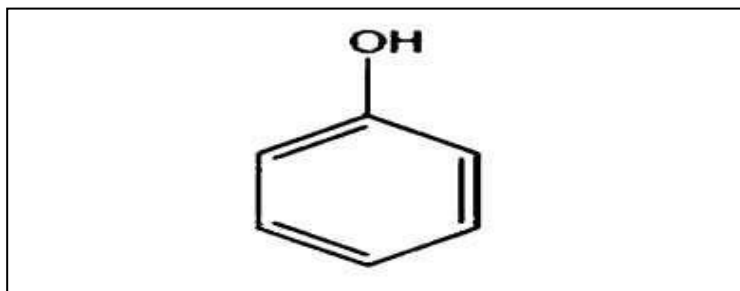
- Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, banthocyanidines, tanins) et les quinones.
- les terpénoïdes et leurs dérivés.
- Les alcaloïdes (Merghem, 2009).

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Bruneton, 1993).

#### I.2. 1 .Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou poly phénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique (Figure 1) au quel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999, Lugasi et *al.*, 2003).

Les polyphénols constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (Haslam, 1989).



**Figure 01** : Squelette de base des polyphénols (Vermerris et Nicholson, 2006) .

Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse ; shikimates ou acide shikimique et de la voie acétate-malonate (Mohammedi, 2013). Ces composés peuvent être classés en un certain nombre de façons. Harborne et Simmonds (1964) ont classés en groupes ces composés sur la base du nombre d'atomes de carbone dans la molécule (Vermerris et Nicholson, 2006) (tableau 01).

**Tableau 01**: Classification des composés phénoliques (Vermerris et Nicholson, 2006).

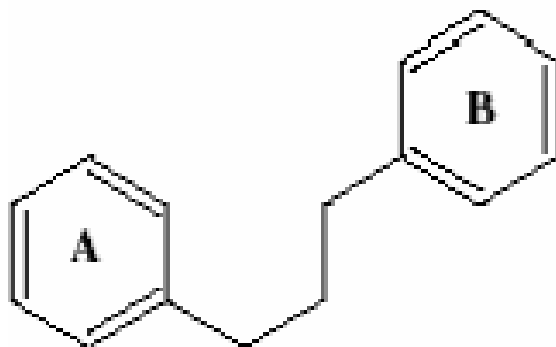
Structure	Classe
C6	Phénols simples
C6-C1	Acide phénolique et composante liée
C6-C2	Acetophenone et acide phenylacetique
C6-C3	Acide cinnamique et aldehydecinnamyle et alcool Cinnamyle
C6-C3	Coumarine, isocoumarine et chromone
C15	Chalcones, aurones, dyhydrochalcones
C15	Flavanes
C15	Flavones
C15	Flavonones
C15	Flavonoles
C15	Anthocyanidines
C15	Anthocyanines
C30	Biflavonyls
C6-C1- C6, C6-C2- C6	Benzophenones, Xanthones, stilbenes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Betacyanines
Lignans, neolignans	Dimers ou oligomers
Lignin	Polymers
Tanins	Oligomers ou polymers
Phlobaphenes	Polymers

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydrox cinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des poly phénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young, 1999; Tapiero et al., 2002**).

### I.2.2 .Flavonoïdes

Le terme «flavonoïde» désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al., 2006**). Ils sont considérés comme les pigments quasi universels des végétaux, Presque toujours hydrosolubles, ils sont, entre autres et pour certains, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Jacques Macheix et al., 2005; Bruneton, 2009**).

tous les flavonoïdes possèdent même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (**Bruneton, 1999**) (fig.2).



**Figure 02** : Squelette de base des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**)

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (**Fig. 3**) : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (**Havsteen et al., 2002; Edenharder et Grünhage , 2003**).

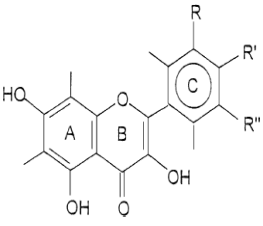
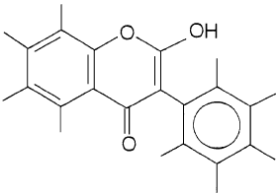
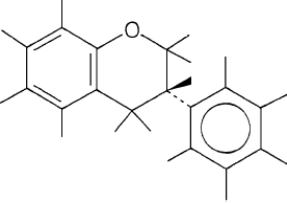
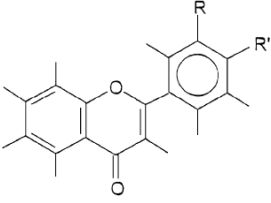
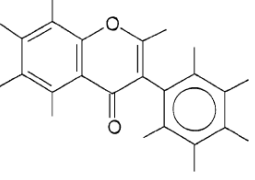
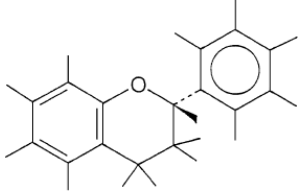
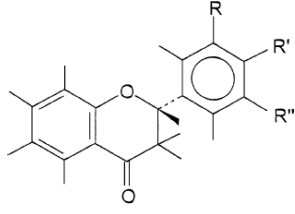
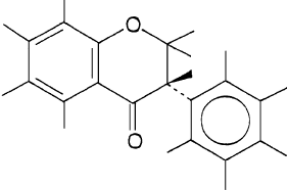
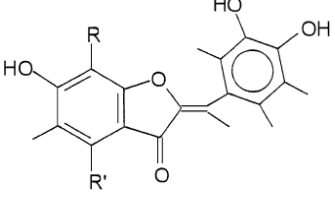
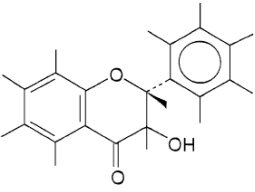
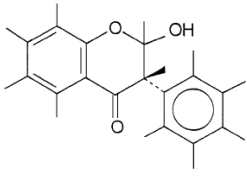
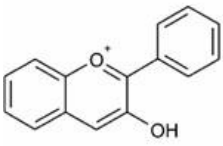
		
<p>Flavonoles</p>	<p>Isoflavonoles</p>	<p>Isoflavanes</p>
		
<p>Flavones</p>	<p>Isoflavones</p>	<p>Flavanes</p>
		
<p>Flavanones</p>	<p>Isoflavanones</p>	<p>Aurones</p>
		
<p>Flavanols</p>	<p>Isoflavanols</p>	<p>Anthocyanidines</p>

Figure 03 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen et al., 2002).

### I.2. 3. Les tanins

Les tanins sont des substances phénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (**Paris et Hurabielle, 1981**). Il existe habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999**).

#### A-Tanins hydrolysables

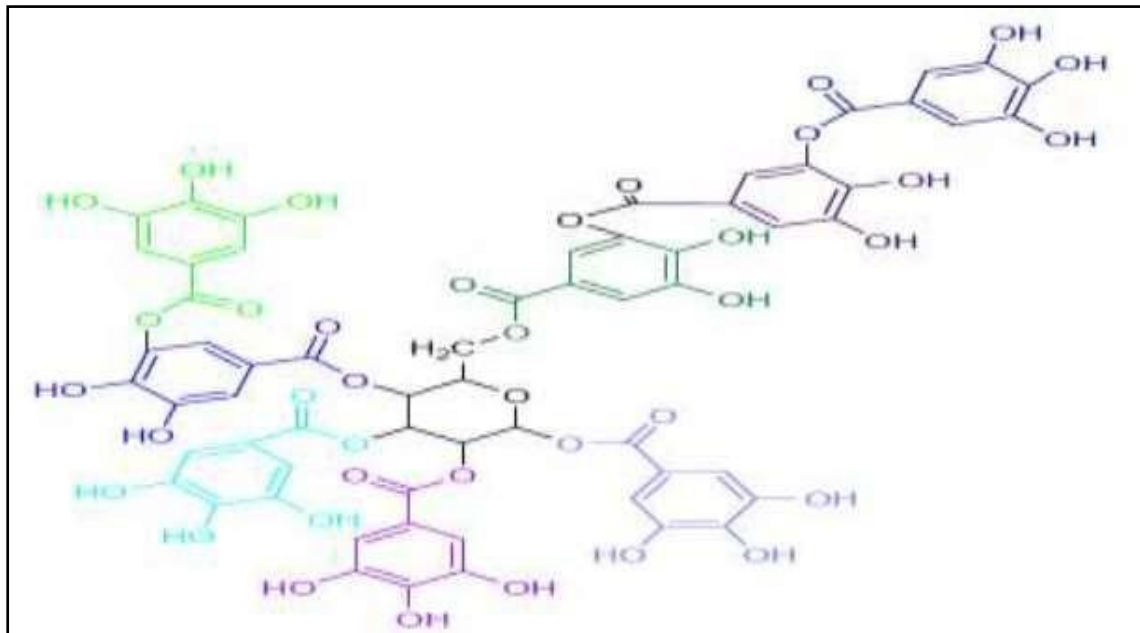
Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques (**Paris et Hurabielle, 1981**).

- **Tanins galliques (Gallo tanins)**

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

- **Tanins ellagiques (Ellagitanins)**

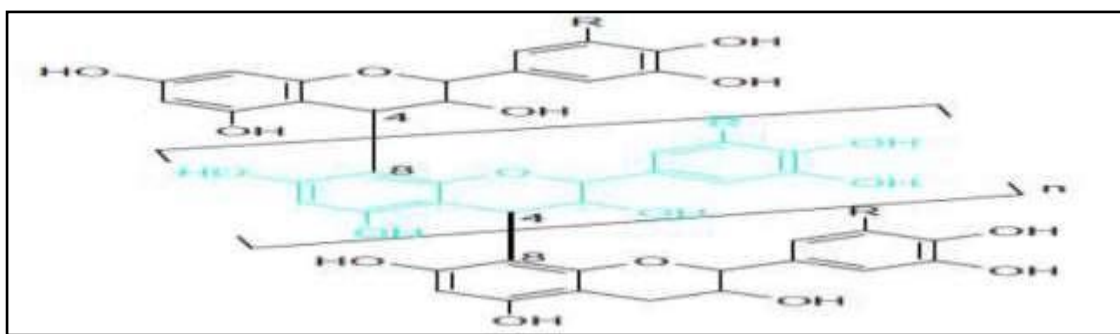
Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (**Paris et Hurabielle, 1981**).



**Figure 04** : Structure générale de tanins hydrolysable (**Gilbert et Norris, 1968**)

### b-Tanins condensés (Anthocyanidines)

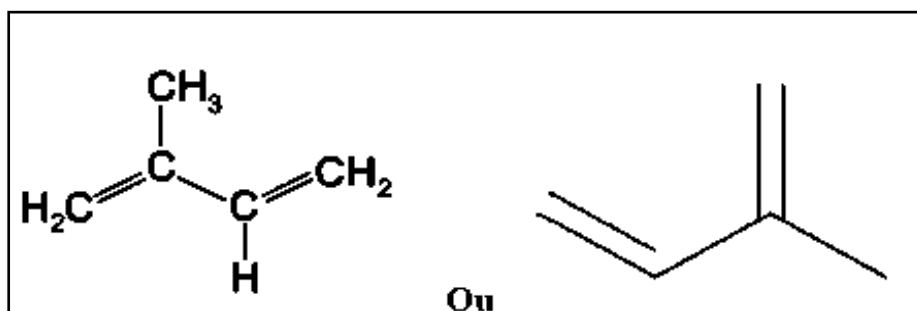
Les tanins condensés sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épi catéchine et catéchine (**Khanbabaea et Ree, 2001**). Les tanins condensés sont molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**Paris et Hurabielle, 1981**).



**Figure 05** : Structure générale de tanins condensés (**Gilbert et Norris, 1968**).

### I.2. 4.Terpenoïdes

Le terme terpène inventé par **Kekulé**, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « *Pistacia Terebinthus* » (**Ayad, 2008**). Terpènes, constituent une vaste groupe de métabolites secondaires, sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique) (**Djahra A.B, 2015**), résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprènes ( $C_5H_8$ ) (figure 05), et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire  $(C_5H_8)_n$  (**Nait Achour, 2012**).



**Figure 06** : Structure de base de l'isoprène (**Khenaka, 2011**).

### I.2. 5. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique), on les trouve dans plusieurs familles des plantes, la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques (**Badiaga; 2011**).

Certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (nicotine, caféine, morphine, lupinine) Des anticancéreuses (vincristine et la vinblastine) (**Djahra, A.B, 2015**).

### I. 3. Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnus par des nombreuses activités biologiques qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales, antioxydantes (**Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999**).

Les flavonols et les flavonones représentent environ 80% des flavonoïdes connus, ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. souvent anti-inflammatoires, ils peuvent être anti allergiques, hépato-protecteurs, diurétiques, antibactériens et antiviraux (**Bruneton, 1999**).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celle des flavonoides vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux.

# ***CHAPITRE II***

**Généralités sur les activités biologiques**

## II. Généralités sur les activités biologiques :

### II. 1. Les activités biologiques des extraits

Le rôle physiologique des extraits pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

#### II. 1. 1. Activité anti oxydante

De nos jours , la propriété anti oxydante a attiré l'attention de nombreux laboratoires et chercheurs dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels utilisés dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques d'une part et d'autre part pour valoriser l'effet préventif de ces métabolites contre les différentes pathologies liées au stress oxydatif (Guinebert *et al.*, 2005).

##### II.1.1.1 .Le stress oxydant

###### 1. Définition

le stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre entre les oxydants que sont les espèces oxygénées activées (EOA), (EOA incluant radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet, acide hypochloreux), et les antioxydants en faveur des premiers (figure 06) conduit à une rupture de la signalisation redox et de son contrôle avec ou sans dommage moléculaire (oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN) (Pincemail *et al.*, 1999).

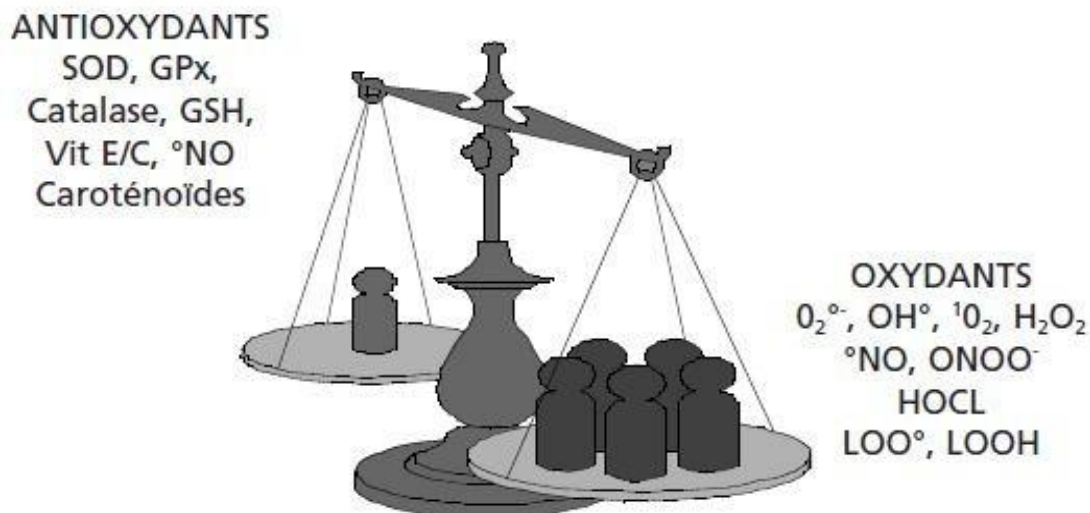


Figure 07 : Déséquilibre Antioxydant /Oxydant (Morena *et al.*, 2002).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique du sport intensif et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante ( **Poirier, J. 2004 et Médart, J. 2009** ) .

### II.1.1.2 Les radicaux libres

#### 1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale externe); cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte (**Goudable, J. & Favier, A. 1997**). de par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner la stabilité (**Delattre et al., 2005**).

#### 2. Différents type des radicaux libres

Dans les cellules On peut distinguer les radicaux libres:

##### a. les radicaux primaires (radical)

Tels l'anion superoxyde  $2O^{\bullet-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ , ils dérivent directement de l' $O_2$  par une réaction de réduction qui jouent un rôle particulier en physiologie (**Favier, 2003**).

##### b. les radicaux libres secondaires (non radicalaire)

tels peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) qui génèrent à la réaction des radicaux libre primaires sur des composés biochimiques cellulaires (**Tableau 04**) (**Lacolley et al., 2007**).

**NB** : (Le symbole  $\bullet$  indique la présence d'un électron célibataire).

Tableau 02 : Principales espèces oxydantes (Mercan, 2010).

Radicals		Non-radicals	
Hydroxyl	$\text{OH}\cdot$	Peroxynitrate	$\text{ONOO}$
Alkoxy	$\text{L(R)O}\cdot$	Hypochlorite	$-\text{OCL}$
Hydroperoxyl	$\text{HOO}\cdot$	Hydroperoxide	$\text{L(R)OOH}$
Superoxyd	$\text{O}_2\cdot$		
Nitric oxidec	$\text{NO}\cdot$	Hydrogène peroxide	$\text{H}_2\text{O}_2$
Peroxyl	$\text{L(R)OO}\cdot$	Singlet oxygène	$1\Delta\text{O}_2$

### II.1.1.3. Les antioxydants

#### 1. Définition

Les antioxydants sont des composés chimiques peuvent être définis comme toute substance permettent de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Ces substances ont pour rôle, d'une manière directe ou indirecte, d'empêcher les ERO et ERN d'atteindre les cibles biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant assister considérablement les mécanismes cellulaires (BouBehri 2014, K. Bouhadjra2011).

#### 2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont souvent, classés selon leur origine dans des catégories différentes parmi lesquelles on cite (figure 07) (K. Bouhadjra 2011, F. Bouras et A. Houchi 2013).

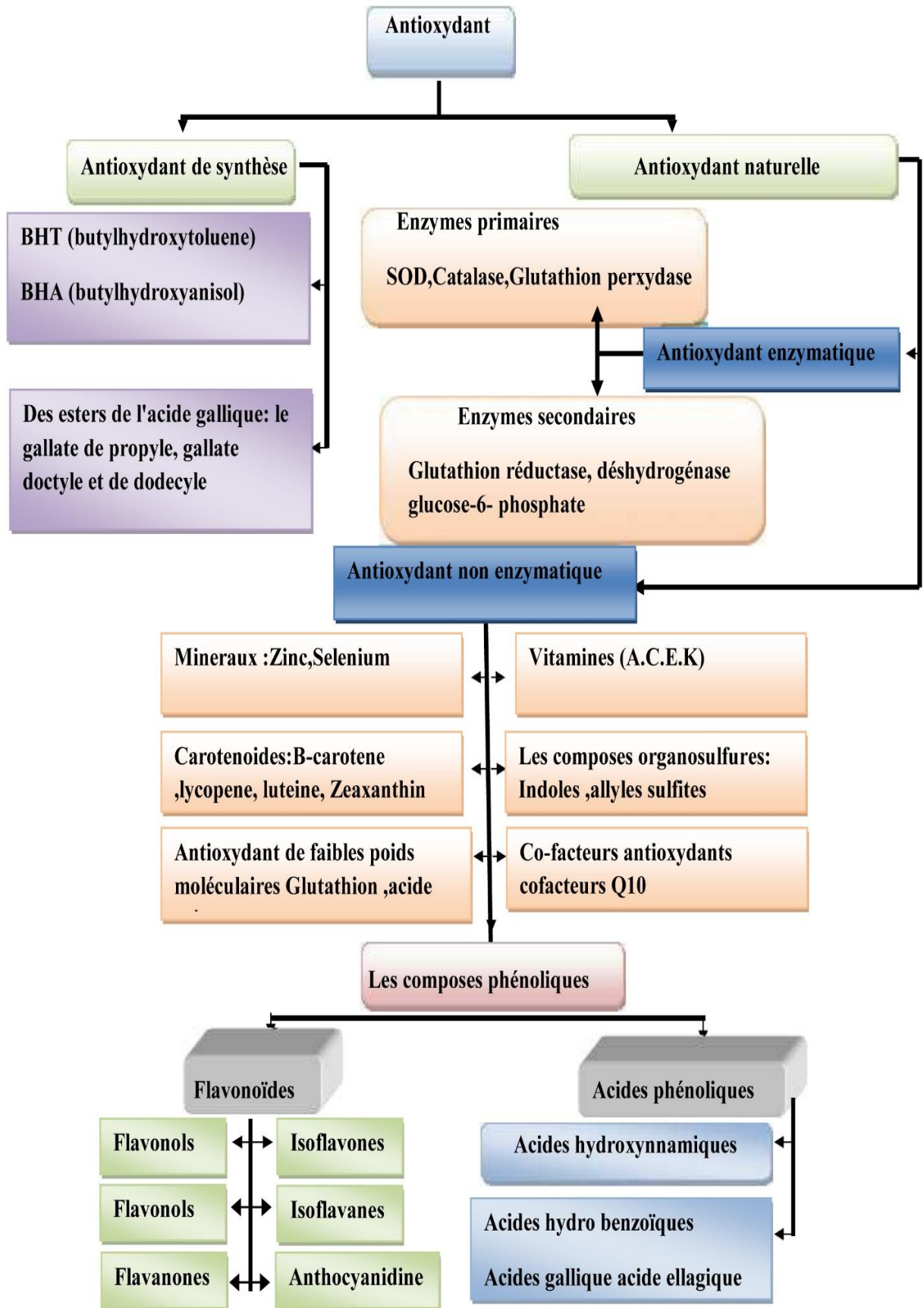


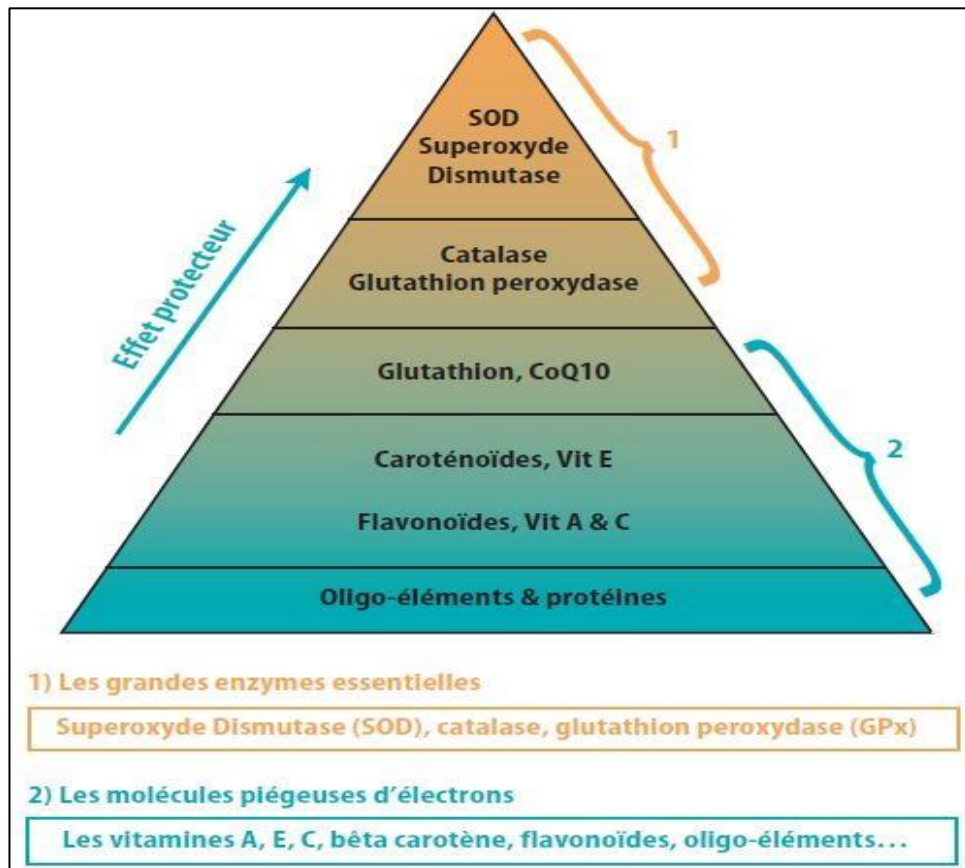
Figure08: Classification des antioxydants (Ratnam et al , 2006)

### 3. Utilisation des antioxydants

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture. (K. Bouhadjra 2011).

### 4. Systèmes de défenses antioxydants

antioxydants au niveau des cellules distinguent deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**figure 08**) (Delattre et al., 2005).



**Figure 09:** les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005)

#### 4.1. Système antioxydant endogène.

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué la première barrière de cette défense antioxydant, qui est constituée de trois métalloenzymes essentielles: les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathions peroxydase (Avissar et al., 1989). Ces enzymes ont une action complémentaire sur l'activité radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

#### 4.2. Système antioxydant exogène.

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation (Vitamine C et E, polyphénols,...) (Ohrvall et al., 1996 ; Goussard, 1999),. Dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

### 5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

La capacité antioxydante n'est, souvent, conclue sur la base d'un seul type de test antioxydant. Plusieurs essais in vitro selon différentes procédures sont suivis pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons d'intérêt.

Plusieurs méthodes sont utilisées dont les noms dérivent, généralement, du nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, parmi celles-ci, on cite (**Tableau03**)

**Tableau03** : les différents tests pour la mesure de la capacité antioxydante globale (T. Mohammed Laid,2014 )

Méthode	Nom	Générateur de radicaux	Standard Mesure/Calcul
TEAC	Total équivalent antioxydant capacité	ABTS + horseradisch peroxydase +peroxyd d'hydrogène formation du radical (ABTS•+)	Décoloration du radical ABTS•-: $\lambda=734$ nm Unité : équivalent Trolox
FRAP	Ferric reducing ability of plasma	Réduction du Fe(III) (TPTZ) <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	Changement d'absorbance à $\lambda=593$ nm Unité : FRAP par rapport à une solution de Fe(II)
DPPH	2,2-diphénylpicrylhydrazyl	DPPH	Diminution de l'absorbance $\lambda=515$ nm Unité : équivalent Trolox
TRAP	Total radical trapping parameter	2,2-azobis (2-amidinopropane) dichlorohydrate (APPH) radicaux peroxydes de nature hydrophile	Diminution de la fluorescence de la $\beta$ -phycoérythrine ( $\lambda=495$ nm et $\lambda=575$ nm). Unité : équivalent Trolox

## 6. Effet des antioxydants sur la santé humaine

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances anti oxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisés. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par notre organisme quand on consomme des végétaux ou des produits dérivés de ceux-ci. Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus antvieillessement et leurs

implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif (**Wolff, 1968 ; Turrens et al., 1985**).

### II. 1. 2 Activité antifongique

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux (**Kaufmann, 1997**). Ces micro-organismes sont largement responsable d'une variété de maladies liées à leur présence dans l'environnement (**Hurst, 1997; Rylander, 1998**).

Les infections fongiques représentent un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde. Les mycoses peuvent apparaître sous la forme d'une simple infection superficielle jusqu'à former des lésions systémiques graves et débilitantes, associées à des taux de mortalité élevés (**Hay, 2006 ; Lupi et al., 2005**).

Ces infections sont causées par des champignons pathogènes humains filamenteux ou par des levures. L'incidence de ces infections a considérablement augmenté ces dernières années, particulièrement à cause de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (**Levinson, 2006a, b**).

La thérapeutique des infections fongiques se base principalement sur l'usage des antifongiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Ganaou ,1972**).

#### II. 1. 2 .1. Généralités sur les champignons

Les Champignons, encore appelés "Fungi" (du latin) ou mycètes (du grec mukês, champignon). Un champignon est un organisme nucléé (eucaryote). Il constitue un groupe autonome au sein du monde vivant, il est uni- ou pluricellulaire, dépourvu de la chlorophylle, ce qui le distingue nettement du règne végétal (**Chabasse et Guiguen c ,1999**). Sa structure est constituée d'un thalle unicellulaire (comme pour certaines levures) ou pluricellulaire (mycélium) comme la plupart des micromycètes (appelés parfois moisissures) ou des macromycètes (**Grillot, 1996**). Les champignons possèdent une paroi composée de chitine, leur assurant une certaine résistance aux contraintes du milieu extérieur. (**Chabasse et Guiguen c ,1999**)

La plupart des champignons utilisent toutes les voies (asexuée, sexuée et végétatives) afin de produire un nombre très important d'unités de propagation telles que les spores ou le mycélium pour la survie et la propagation (**Prabhu et al ., 1992**).

La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (**Meyer et al ., 2004**). On distingue 3 groupes de champignons (**Ibnelhaj, 2010**).

↳ Les champignons levuriformes :

Les levures sont des champignons unicellulaires ronds ou ovoïdes, qui se reproduisent par bourgeonnement ou par fission (ex: les candidas).

↳ Les champignons filamenteux :

Tous les champignons filamenteux possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (ou hyphes), l'ensemble est appelé thalle ou mycélium (ex: les aspergillus).

↳ Les champignons dimorphiques:

Ce sont des champignons exotiques adaptés au parasitisme

### **II. 1. 2.1. Les souches fongiques étudiées dans les tests antifongiques**

#### **A. *Candida ssp*:**

*Candida* est un genre de levures qui est répandu dans tout le monde habité et forme normalement un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale, en fonction des espèces (**Pfaller et Diekema , 2007**). Il devient pathologique et provoque parfois des mycoses (candidiase ou candidose) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli. (**Benedict, et Colagreco, 1994**). Parmi le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *albicans*, 16,4% à l'espèce *glabrata*, 14,9% à l'espèce *parapsilosis*, 8,2% à l'espèce *tropicalis*, et 1,6% l'espèce *krusei* (**Pfaller et al 2000**).

**Tableau 04:** classification de genre *Candida* (Lestscher, 2004).

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Saccharomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Famille</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Candida</i>
<b>Sous-genre</b>	<i>Albicans, glabrata, parapsilosis</i>

**B. Les *aspergillus* spp.**


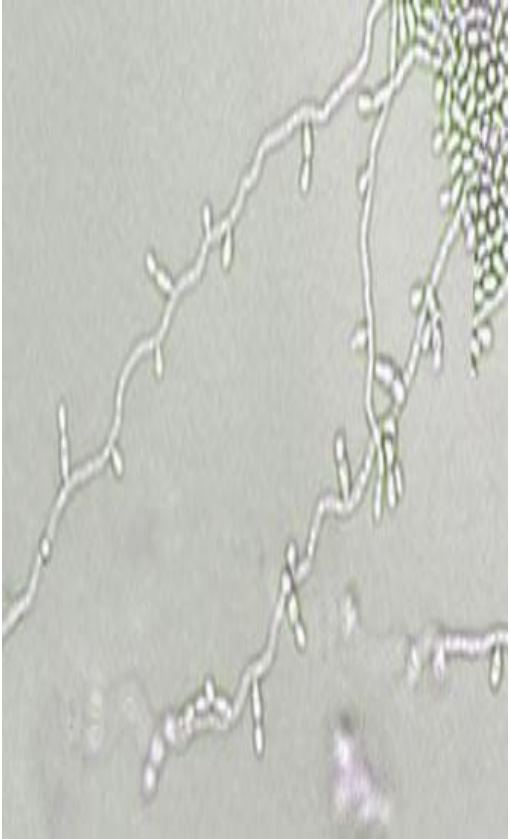
Les *aspergillus* sont des champignons saprophytes de l'environnement. comprend environ 180 espèces (Gam et al., 1986). Ces moisissures se développent aux dépens des végétaux en décomposition (McCormick, 2010), tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc...) (Botton et al., 1985). Certains d'entre eux sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques pour les mammifères, parfois responsable d'infections opportunistes (il n'est habituellement pathogène que chez l'hôte immunodéprimé) (Gam et al, 1986).

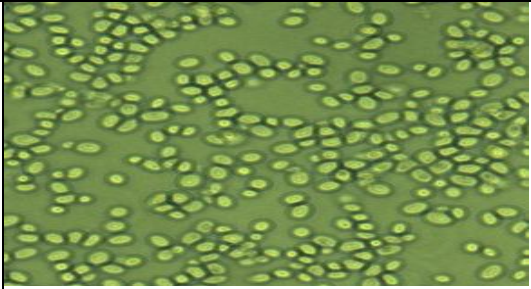
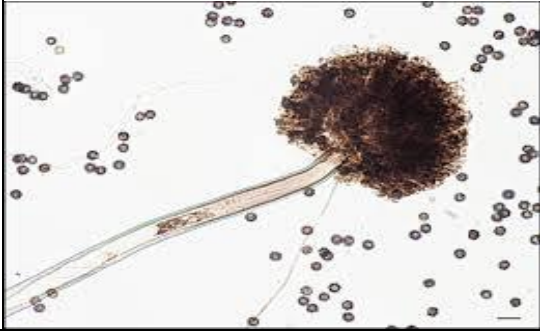

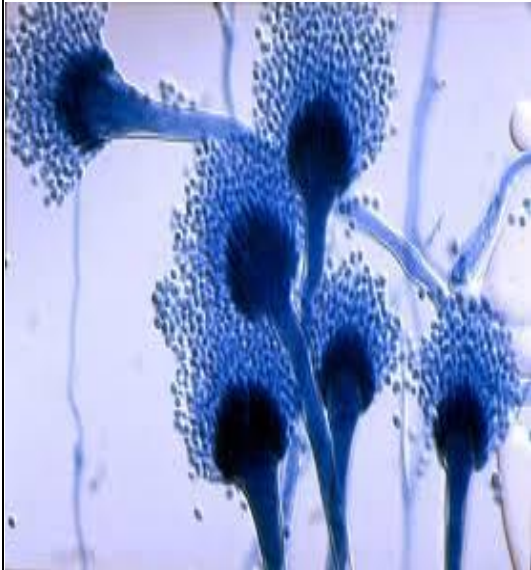
**Tableau 05:** classification de genre *Aspergillus* (Rossignol, 2010)

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Sous-division</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Classe</b>	<i>Eurotiomycetes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Eurotiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>
<b>Sous-genre</b>	<i>Flavus, niger, fumigatus....</i>

## II. 1.2.3. Description des espèces sélectionnées

Tableau 06: description des espèces sélectionnées.

<i>Candida albicans</i>	
<p><i>Candida albicans</i> est l'espèce la plus importante et la plus connue du genre <i>Candida</i>, vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humaine (<b>Lestscher, 2004</b>). Elle provoque des infections fongiques (candidase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique (<b>Moulinier 2003</b>).</p>	
<i>Candida tropicalis</i>	
<p>Levures de forme variable rondes à allongées. Reproduction par bourgeonnement multilatéral.</p> <p>Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant. et Levures non pigmentées.</p> <p>Elle est retrouvée dans les voies digestives et urinaires (<b>Lestscher, 2004</b>). On peut la retrouver dans le milieu extérieur : le sol, les végétaux et de l'eau. Elle est responsable de vaginites et de candidoses systémiques.</p> <p>Infections profondes invasives uniquement chez l'immunodéprimé (candidémie, méningite, infection des os, abcès divers) (<b>Moulinier 2003</b>).</p>	

<b><i>Candida glabrata</i></b>	
<p><i>Candida glabrata</i> est une levure haploïde du genre <i>Candida</i>, le saprophyte des voies génito-urinaires chez l'homme, qui ne filamente pas (Lestscher, 2004).</p>	
<b><i>Aspergillus niger</i></b>	
<p>l'aspergille noire, C'est une des espèces les plus communes du genre <i>Aspergillus</i> qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes. Il se développe sur des substrats variés (MOULINIER C,2003).</p>	
<b>L'aspergillus fumigatus</b>	
<p>c'est l'espèce la plus pathogène, fréquemment rencontré dans les climats tempérés, il est retrouvé dans l'air, le sol, sur les céréales, les matières organiques en décomposition.</p> <p>Ses spores sont responsable de 80 à 90% d'infestation fongique comme l'aspergillose bronchopulmonaire et l'aspergillome (McCormick, 2010).</p>	
<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	
<p>Cette moisissure retrouvée plus fréquemment dans les régions tropicales où il se développe sur le fruit de l'arachide sur lequel il peut produire des aflatoxines (qui sont actuellement considérée comme le plus important agent carcinogène d'origine naturelle connu).</p> <p>Il est aussi un microbe pathogène opportuniste engendrant des infections envahissantes et non envahissantes chez l'homme ainsi que chez certains animaux et insectes (MOULINIER C,2003).</p>	

## II. 1. 2 .4 . Les principales substances antifongiques

### II. 1. 2 .4.1.1es anti fongiques

Une substance antifongique ou antifungique (appelée également fongicide ou fongistatique) est une substance possédant la capacité de tuer ou de limiter la prolifération des champignons microscopiques (**Bergogne-berein et Dellamonica, 1995**).

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent être divisés en 5 groupes selon leur mode d'action (**Odds et al., 2003**). Ils peuvent agir au niveau de l'enveloppe cellulaire, souvent en altérant son intégrité, mais également en agissant dans le cytoplasme. Ainsi l'acide nucléique, les synthèses protéiques, les microtubules et surtout la voie de synthèse de l'ergostérol sont les cibles privilégiées des molécules antifongiques disponibles sur le marché (**Mathew et Nath .2009**).

### II. 1. 2 .4.2. Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est démontré par de nombreuses recherches expérimentales (**ULANOWSKA et al., 2007**). Ces agents forment des complexes avec l'ergostérol et traversent la membrane plasmique du champignon, en provoquant une altération de la perméabilité de la membrane, une perte des constituants cytoplasmiques et la mort de la cellule (**Georgo papadakou et Walsh, 1996**).

# ***CHAPTIRE III***

**Généralités sur la plante étudiée**

### III. Généralités sur la plante étudiée (*Vitis vinifera*)

#### III.1. Généralités de la vigne

la vigne est une des plantes les plus anciennement cultivées, qui a pris naissance il y a quatre mille ans environ (**Rowley et Ribaut, 2003**), elle possède de grandes facultés d'adaptation aux conditions pédoclimatiques. elle est cultivée dans les régions chaudes et également sous des climats relativement froids (**Reynier, 1989; Galet, 1998**).

La vigne est une plante grimpante pérenne à croissance indéterminée, à tiges sarmenteuses qui appartient à la famille des Vitacées. Capable de se multiplier par voie sexuée, par bouturage ou par greffage (**This et al, 2006**). elle est cultivée pour ses fruits charnus : les baies de raisin.

Selon la publication de (**l'OIV, 2010**), Il en existe d'innombrables variétés cultivées appelées cépages Cabernet, Chardonnay, Merlot, Pinot, Sauvignon, etc. La culture de la vigne, ou viticulture, occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde.

La constitution d'un vignoble nécessite du temps: il faut attendre 3 ans pour obtenir les premiers fruits, 10 à 12 ans pour avoir un rendement significatif, et 25 ans pour arriver à la pleine production. La qualité organoleptique augmente avec l'âge du cep (**REYNIER, 2007**)



**Figure 10:** La plante de la vigne (**Petit, 2008**).

### III.2. Systématique de la vigne.

La vigne, plante Angiosperme dicotylédone, est une liane de la famille des Vitacées, ordre des Rhamnales, cette famille était autrefois appelée Ampélidées ou Ampélidacées (Huglin P. et Schneider C., 1998).

Selon Galet (2001) elle comprend 19 genres et 62 espèces, Le genre *Vitis*, originaire des zones chaudes ou tempérées de l'hémisphère nord (Amérique, Europe et Asie). Est composé par deux sous-genres : *Muscadinia* et *Euvtis* ou *les vraies vignes* dont la quasi-totalité des vignes cultivées font partie. A l'intérieur d'Euvtis on distingue trois principaux groupes : le groupe Euro méditerrané en représenté par une seule espèce (*Vitis vinifera*), le groupe Asiatique par une dizaine d'espèces et le groupe Américain par une vingtaine d'espèces.

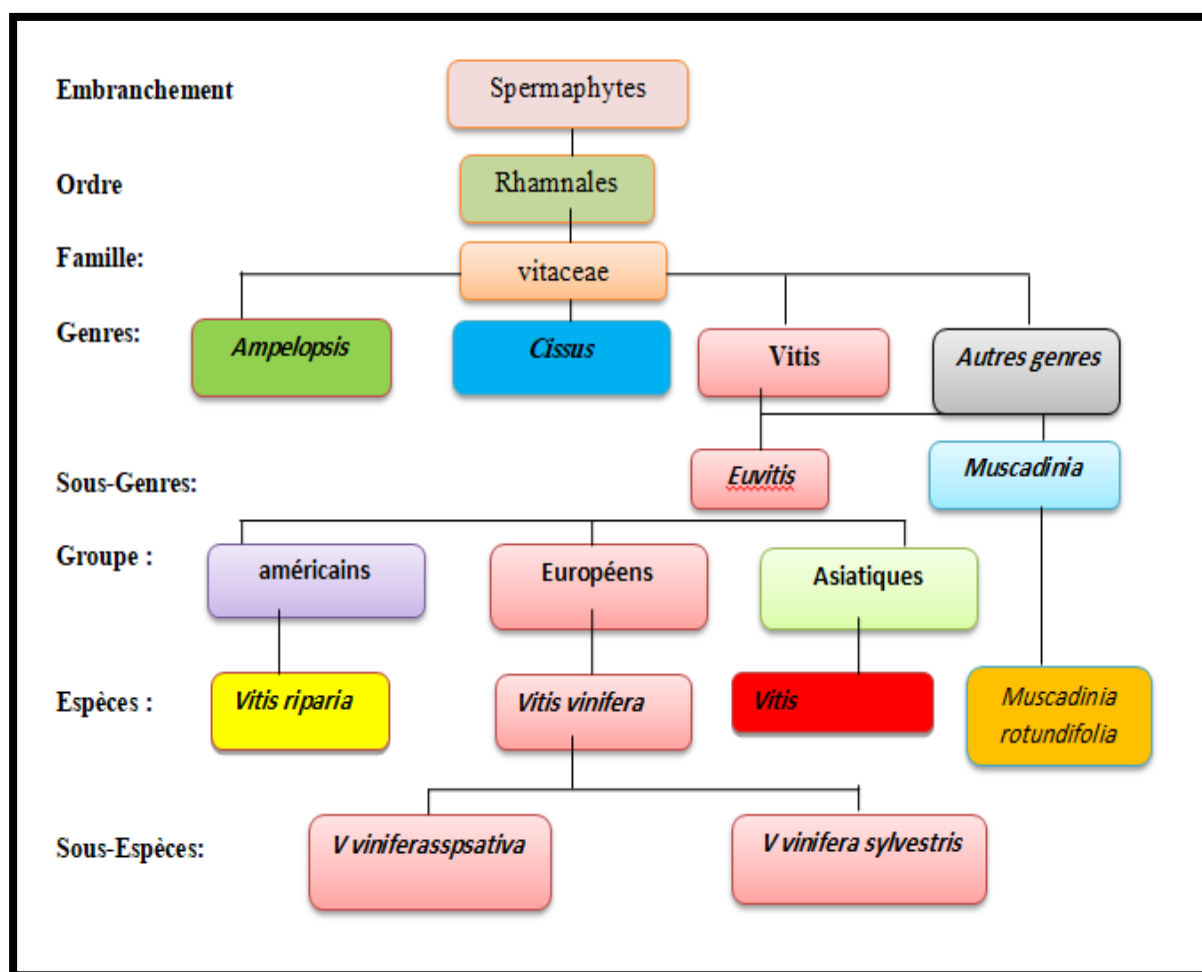


Figure 11: Systématique des vignes (Huglin P. et Schneider C., 1998).

### III .3. Présentation l'espèce étudiée (*Vitis vinifera*)

#### III.3.1. Caractéristique Botanique de l'espèce (*Vitis vinifera*)

*Vitis vinifera* est une liane pérenne, ligneuse, à tiges sarmenteuses qui appartient à la famille des Vitacée. Dans laquelle on distingue la vigne sauvage *Vitis sylvestris* et de la vigne cultivée *Vitis saliva* (Johnson, 1990).

*Vitis vinifera* est l'espèce viticole la plus commune et la plus importante au niveau économique, Malgré l'existence des milliers de cépages (Galet, 1993). Elle est cultivée pour ses fruits en grappes. C'est la principale espèce de vignes cultivée dans en Europe, l'ouest de l'Asie (Moyen-Orient, Caucase) et le nord de l'Afrique. Elle est, en effet, à l'origine de très nombreux cépages (cabernet, merlot, pinot, sauvignon, etc....) (Galet, 2000).

#### III.3. 2. Classification Scientifique de l'espèce (*Vitis vinifera*)

La classification des plantes de la famille *Vitacées* des est la suivante (tableau07).

**Tableau07:** Classification scientifique de *Vitis vinifera* (Reynier, 2007).

Règne	Plante
<b>Sous-règne :</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Rhamnales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Vitaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Vitis</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Vitis vinifera</i>

### III.3.3. Description Botanique de l'espèce (*Vitis vinifera*)

La description botanique de L'espèce (*Vitis vinifera*) est résumée dans le (tableau08).

**Tableau 08** : Description botanique de la vigne (*Vitis vinifera*).

Description	Image
<p><b>A. La racine :</b></p> <p>Elle constitue la partie souterraine de la plante, la racine se ramifie, au cours de son développement, pour former un réseau de racines appelé système racinaire (Reynier, 1991).</p> <p>Selon Galet (1993), la racine a une forme cylindrique, avec un aspect plus ou moins sinueux et une couleur d'abord blanchâtre, devenant ensuite jaune brune. L'extrémité terminale comporte un cône obtus appelé la coiffe.</p>	 <p><b>Figure12</b> : Les racines de la vigne (Hidalgo, 2005).</p>
<p><b>B. le tronc :</b></p> <p>est la partie principale du corps d'un arbre, généralement dénudée, il est une liane arbustive, compris entre les racines et les sarments les plus bas. recouvert par l'accumulation de vieilles écorces (rhytidome), Il se ramifie en plusieurs branches ou bras qui portent les rameaux de l'année, (Galet, 1993).</p>	 <p><b>Figure 13:</b> le tronc de la vigne (Huglin.P, 1986)</p>
<p><b>C. La fleur :</b></p> <p>Les fleurs de vigne sont pentamères, elles ont une taille très petite (de 2 à 7 mm). Le nombre de fleurs par inflorescence dépend du cépage et de la localisation de l'inflorescence sur le rameau, peut varier de 30 à 450. La taille et l'ébourgeonnage doivent donc favoriser la présence d'inflorescences porteuses de nombreuses fleurs. (Huglin et Schneider,1998).</p>	 <p><b>Figure14:</b> La fleur de la vigne (Huglin.P, 1986)</p>

**D. Rameau :**

On appelle rameau la partie herbacée de la tige de la vigne (*Villa., 2005*).

Les rameaux grossissent précisément à l'endroit où s'insèrent les feuilles, les bourgeons, les vrilles et les petites grappes de fleurs qui se transformeront ultérieurement en grappes de fruits (raisins) (*Huglin et Schneider, 1998*). Ce point de grossissement s'appelle un nœud; Les parties comprises entre les nœuds s'appellent entrenœuds ou mérithalles. (*Hidalgo L., 2008*).



**Figure15:** Rameau de la vigne (*Reynier, 2007*).

**E. Les feuilles :**

sont rattachées au rameau par un pétiole cylindrique de longueur variable. La taille des feuilles peut varier de 50 à 500 cm<sup>2</sup>, suivant les espèces et les cépages. Elles sont composées d'une queue ou pétiole et d'une partie élargie et étalée, appelée limbe qui comprend 5 nervures principales et qui se ramifient en nervures secondaires. Le plus souvent, les feuilles sont entières mais présentent des sinus plus ou moins profonds. Pour former finalement un réseau de canicule qui alimentent et soutiennent la feuille (*hidalgo, 2012*).

La villosité du limbe, la forme et la profondeur des dents, ainsi que la couleur interviennent également dans la description qui permet de classer des espèces et des cépages (ampélographie). (*Huglin et Schneider, 1998; Mullins, et al., 1992; Galet, 2000*).



**Figure 16:** La feuille de la vigne (*Reynier, 2007*).

**F. Le raisin:**

Est le fruit amélioré de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*). Il se présente sous la forme des grappes composées de nombreux grains, qui sont sur le plan botanique des baies, de petite taille et de couleur claire, le raisin blanc (verdâtre, jaunâtre, jaune doré) ou plus foncée, le raisin rouge (rose ou noir-violet) (hidalgo, 2012).



**Figure17:** Le raisin de la vigne (Huglin et Schneider, 1998).

### III.3.3.4. Les principaux constituants chimiques de *Vitis vinifera*

Les principaux constituants chimiques de *Vitis vinifera* sont consignés dans le **Tableau 09** (Ghedira, 2012).

**Tableau 09 :** Les principaux constituants chimiques de *Vitis vinifera*.

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
<b>Anthocyanosides</b>	O-glucosides du cyanidol et du péonidol
<b>Acides phénols</b>	Acide monocaféyl-tartrique, acides phénylpropanoïques
<b>Tanins</b>	Tanins hydrolysables (esters du glucose et des acides galliques et déhydrohexahydroxydiphénique)
<b>Hétérosides de flavonols</b>	Glucosides de flavonols : quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide, isoquercitrine (quercétine-3-O- $\beta$ -glucoside), et kaempférol- 3glucoside

### III.3.3.5. usage thérapeutique

Les feuilles de *Vitis vinifera* possèdent des Propriétés médicinales, Analgésique, Anti-inflammatoire, Antioédémateux, Antiseptique, Antimicrobien, Antioxydant, Astringent et Homéostatique.

↳ Du point de vue thérapeutique, la vigne est reconnue pour aider à renforcer les vaisseaux sanguins (**Henriet JP 2011**) et réduire ou contrôler l'inflammation (**Castilla P, Echarri R, et al. 2006**). En effet, la vigne a cliniquement démontré pouvoir soulager la douleur, l'enflure et l'œdème associés aux varices et à l'insuffisance veineuse chronique, ainsi que traiter les varicosités, les raideurs et douleurs articulaires, et encourager la réparation cellulaire (**Kiesewetter H, Koscielny J, et al.2000**).

↳ auraient un effet positif sur plusieurs facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (**Rakici O, Kiziltepe U, et al., 2005;Vislocky LM et al. 2010**). en réduisant notamment le taux de « mauvais cholestérol » (LDL) (**Zern TL et al. ; 2005; Castilla P, Dávalos A, et al., 2008**) inhiberaient l'agrégation des plaquettes sanguines ( **Shenoy SF, Keen CL, et al., 2007**) diminueraient la pression sanguine (**Park YK, Kim JS, Kang MH. Biofactors. 2004;**) et réduiraient le stress oxydatif de l'organisme ( **Zern TL et al. ; 2005**).

↳ Tout comme l'extrait de pépins de raisins, la feuille de vigne jouit également de puissantes propriétés antioxydants; ainsi, en combinaison ils offrent aux cellules une protection musclée contre les dommages des radicaux libres et soutiennent la fonction immunitaire (**Castilla P, Echarri R, et al. 2006**).

↳ La vigne a aussi une activité antimicrobienne scientifiquement démontrée contre plusieurs organismes : *Escherichia coli* et *Salmonella Infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Campylo bacterjejuni*(**Del Iorman O et al 2009**).

↳ Enfin, la vigne est utile pour traiter les symptômes du syndrome de fatigue chronique, la diarrhée, les hémorroïdes, les fissures anales, et autres.

*Partie 02:*

---

*La partie  
expérimentale*

# ***CHAPITRE I***

## ***Matériels et méthodes***



## Chapitre I : Matériels et méthodes

### ✱ Cadre d'étude

Ce travail a été effectué au sein des laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Echahid Hamma Lakhdar *d'El-oued* sans oublier le laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (laboratoire de recherche appartient au faculté de technologie) et laboratoire El –madjed. Ce dernier qui s'occupe de l'extraction et de la caractérisation des feuilles de *Vitis vinifera*.

Ce travail se repose sur le protocole expérimental suivant:

- ↪ L'extraction et teneurs des composés phénoliques des feuilles de *Vitis vinifera* par macération.
- ↪ Les tests phytochimiques des feuilles de *Vitis vinifera*.
- ↪ Dosage des polyphénols, des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés des feuilles de *Vitis vinifera*.

### ➤ Tests antioxydants:

Etude de pouvoir antioxydant des feuilles de *Vitis vinifera* par quatre méthodes :

- ↪ Activité antioxydante totale (TAC)
- ↪ Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)
- ↪ Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)
- ↪ Test d'hémolyse (H %.)

### ➤ Tests antifongiques:

- ↪ Etude de l'activité antifongique vis-à-vis de quelques souches fongiques.
- ↪ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).


## I.1 Matériels

## I.1.1. Matériels biologiques

## I.1.1. 1. Matériels végétaux

La plante étudiée dans notre travail est *Vitis vinifera*, la période de récolte des échantillons, chaque espèce des feuilles de *Vitis vinifera* ont été récoltés le même jour, c'est ce qui est présenté dans le tableau ci-dessous (**Tableau10**) avec l'âge et les caractéristiques de chaque espèce étudiée.

**Tableau 10:** Caractéristiques des échantillons analysés

La partie étudiée	Origine	Date de récolte	L'âge	Caractéristiques
Variété mokrani blanc(MB)	Bayadha	26 Janvier 2018	1 an	
Variété ahmer bouamer (AB)	Débila	26 Janvier 2018	20 ans	

## I.1.1. 1.1. Situation géographique de zone de récolte:

La plante utilisée dans notre étude a été collectée au mois de janvier 2018 à partir de deux stations différents **El Bayadha** et **Debila** situés à wilaya d'El oued (Algérie). Cette willaya est d'une superficielle de 44586.80Km<sup>2</sup>, est limitée au nord par la willaya de kenchela au nord-est par la willaya de tébessa ,au nord-ouest par la willaya de biskra , à l'ouest par la willaya de Djelfa , au sud-ouest par la willaya d'Ouargla, et à l'est par la Tunisie, cette ville saharienne se caractérise par un climat aride et sec (**Neguia,2014**) .

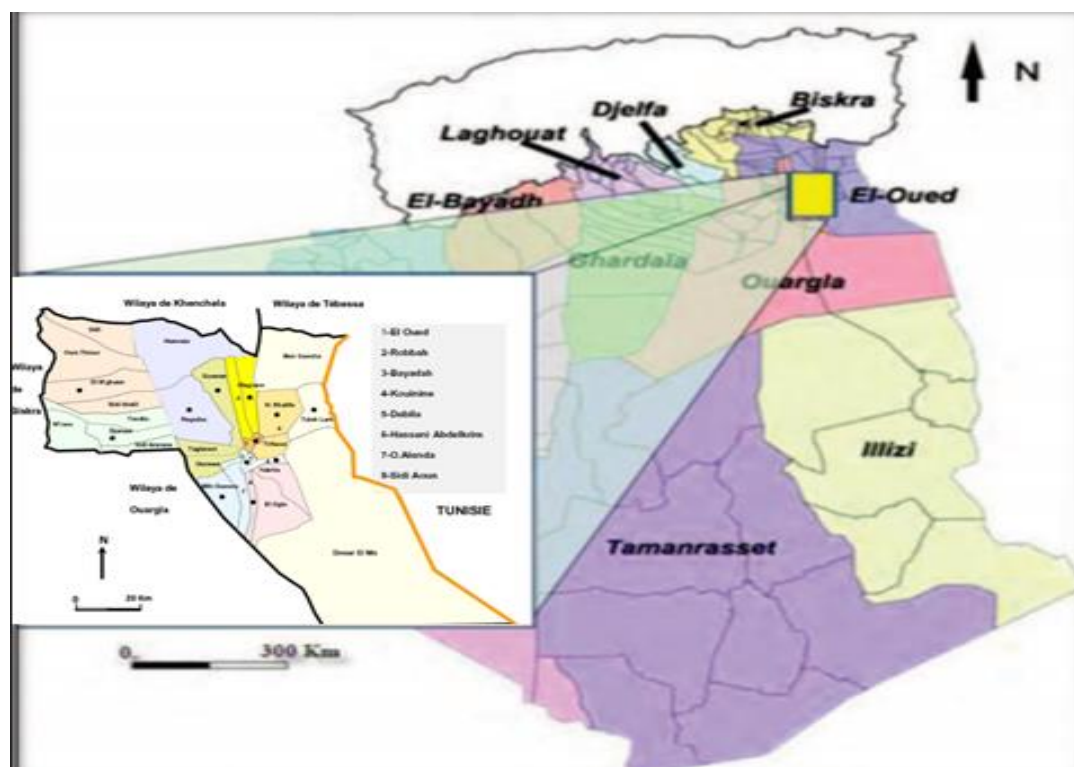


Figure 18: Situation géographique d'El oued.

### I.1.1. 2. Matériels vivant biologiques

#### I.1.1. 2. 1. Microorganismes utilisés

Les propriétés antifongiques des feuilles de *Vitis vinifera* ont été vérifiées sur les champignons situés dans le tableau suivant :

Tableau 11: espèces des souches fongiques testées.

Les champignons	Espèces :	Source :
Les levures	Candida albicans	Laboratoire d'analyse médicale El-taoufik –Tunis.
	Candida tropicalis	
	Candida glabrata	
Les moisissures	Aspergillus fumigatus	faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Biskra.
	Aspergillus flavus	
	Aspergillus niger	

**I.1.1. 3.Le sang :** Le sang a été collecté à partir d'une volontaire saine de 35 ans.

### **I.1.2. Les matériels de technique d'étude au laboratoire**

#### **I.1.2.1.Les produits et réactifs**

Trichloride d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) 2%; magnésium ; Folin Ciocalteu ; 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH) ; acide ascorbique ; acide galique ; Vanilline (99,5%) ; diméthyle sulfoxyde (DMSO) ; gélatine ; TPTZ (tripyridyltriazine) ; acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ; eau oxygéné (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ; méthanol ; chlorure d'hydrogène (HCL);Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); Chlorure Ferrique (FeCl<sub>3</sub>); Quercétine d'hydraté C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub> (97%); Acide Sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) Concentré ;liqueur de Fehling; d'acide acétique.

#### **I.1.2.2 Appareillages**

- Spectrophotometer(UV-1240 SHIMADZU)
- Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210)
- Micropipettes ajustables
- Centrifugeuse sigma
- Etuve(Mommert, Beschickung-Loadig Model 100-800)
- chromatographique
- Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0. 1mg)

## **I. 2. Méthodes**

### **I.2.1 .Préparation du matériel végétale :**

#### **A. Séchage et conservation :**

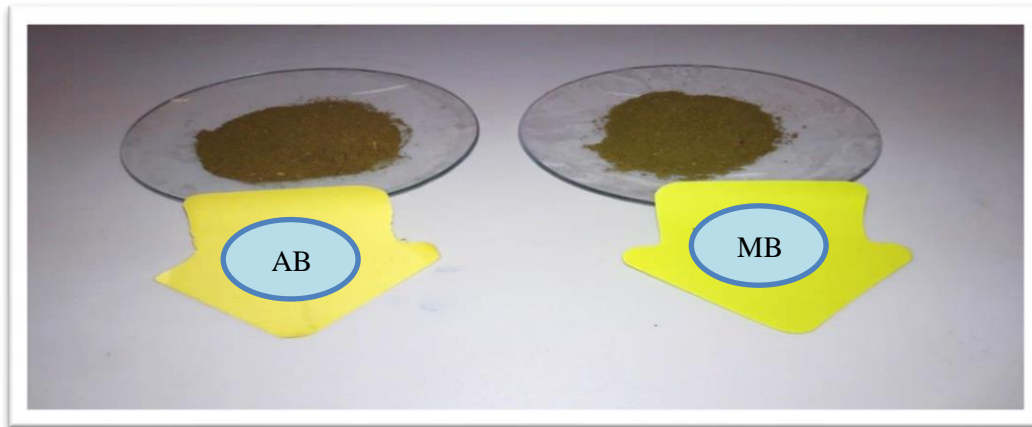
Les feuilles de *Vitis vinifera* ont est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température Ambiante. Le séchage a été réalisé pendant 15 jours en moyenne pour les différentes espèces.

#### **B. Broyage :**

Les feuilles de *Vitis vinifera* séchés ont été broyé, à l'aide d'un broyeur électrique (**SAYONA model no : SJ-638**), en une poudre fine pour permettre une meilleure extraction.

### C. Tamisage:

La poudre obtenue suite au broyage a été tamisée à l'aide d'un tamis ayant un diamètre de 125  $\mu\text{m}$ , pour récupérer à la fin une poudre très fine. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux en verre fermés hermétiquement et placés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à leur utilisation.



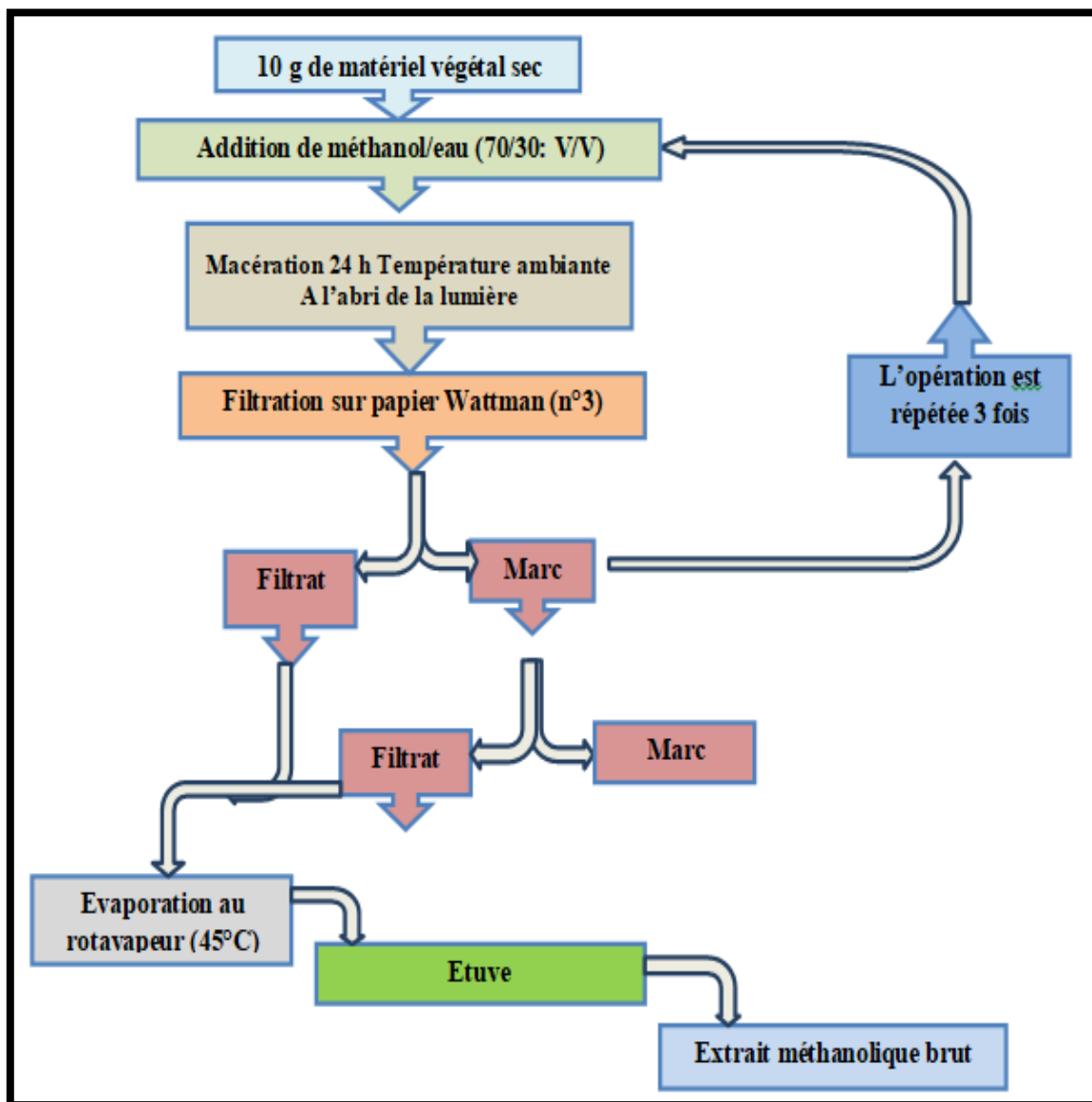
**Figure19** : Poudre des feuilles des deux variétés AB et MB d'espèce *Vitis vinifera*.

## I.2.2 Méthodes d'analyse

### I.2.2.1. Extraction des composés phénoliques :

#### I .2.2.1. 1. Préparation des extraits bruts (composés phénoliques) :

L'extrait méthanolique des feuilles de *Vitis vinifera* été préparé à partir de 10 g de poudre, qui ont été mis à macérer dans un mélange méthanol/eau (70/30: V/V) équivalent à 50 ml. Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire pendant trois jours successifs avec changement du solvant chaque 24h à la température ambiante et à l'abri de la lumière, Ensuite le mélange est filtré sur papier Wattman (n°3). Après la troisième macération. le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur, puis séché à l'étuve à une température ne dépasse pas 45°C, et conservé jusqu'à l'utilisation (Talbi *et al* ., 2015).



**Figure 20 :** Protocole de préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de *Vitis vinifera* par macération (Talbi *et al.*, 2015).

#### I.2.2.1.2 . Rendement d'extraction des composés phénoliques

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous :

$$\text{rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de résidu extrait}}{\text{Masse initial de végétale}} \times 100$$

Nous pouvons déterminer le rendement des feuilles de *Vitis vinifera* par la formule donnée par (Falleh *et al.* , 2008).

### **I.2.3. Analyses qualitatives**

#### **I.2.3.1. Screening phytochimique**

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans un échantillon donné.

Le principe est soit basé sur la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions des précipitations, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou instauration dans une molécule) (**Mohammedi, 2013**).

##### **A. Test des saponines**

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml de chacun des extraits méthanolique dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Bidie et al., 2011**).

##### **B. Test de tannins**

Les tanins sont mis en évidence par mélange de 0.5 ml d'extrait placé dans un tube avec présence de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (1% préparé au méthanol). Après l'agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqes (**Karumi et al., 2004; Rizk, 1982**).

##### **C. Test des flavonoïdes**

Traité 0.5ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3minutes (**Bouhadjera et al. 2005**).

##### **B. Test des Alcaloïdes**

À 1 ml de chaque extrait, 5ml d'HCl 1% sont ajoutés. Chaque mélange est chauffé aubain marie, puis divisé en deux volumes égaux. Les 2 volumes sont traités séparément par les réactifs de :

✓ **DRAGENDORFF** : (réactif à l'iodobismutate de potassium) qui donne une précipitation a une blanche (**MAJOB et al.,2003**).

✓ **MAYER** : qui donne une précipitation blanche ou brun (**MAJOB et al.,2003**).

**E. Test des sucres réducteurs**

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans les extraits végétaux par le réactif de Fehling. Pour 5ml d'extrait brut sont additionnés 5 ml de liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3min de chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive (**Békro et al.,2007**).

**F. Test des Terpénoïdes**

À 5 ml d'extrait, sont ajoutés 2 ml de chloroforme et 3 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.Le test positif est indiqué par l'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface (**KABLAN et al., 2008**).

**I.2.3 .2 .Analyse par chromatographie H.P.L.C**

C'est une méthode physico-chimique basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la phase mobile (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression au travers de la colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase stationnaire (**NOLLET et TOLDRA, 2013**).

L'analyse est réalisée par sur un chromatographe (**SHIMADZU SPD-10A**) au niveau du laboratoire de Valorisation et technologie des Ressources Sahariennes (VTRS), Université Hamma Lakhdar d'EL Oued.

**I.2.4. Analyses quantitatives**

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

**I.2.4.1 .Dosages des composés phénoliques**

La détermination des composés phénoliques : polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT), flavanols totaux (FLT) et tannins condensés (TC) présents au niveau des différents extraits a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type **Shimadzu UV-Vis 1800**.

### 2.4.1.1. Dosage des poly phénols totaux (PPT)

#### ➤ *Principe*

Le dosage des polyphénols est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalte.

Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange des complexes de sels de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleu. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Ainsi, le dosage des PPT se fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique (**Waterhouse, A. 1999**).

#### ➤ *Mode opératoire*

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0.2 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.02 jusqu'à 0.16 mg/ml, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée est ajouté puis immédiatement. Après 5min, on ajoute 0.8ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  (7.5%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 765nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Yogita, et al 2013**).

### I.2.4 .1.2.Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

#### ➤ *Principe*

Le réactif utilisé est: le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ , 2%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par ce réactif, elle entraîne la formation d'un complexe jaune absorbe à 415 nm (**Lagnika, 2005**)

#### ➤ *Mode opératoire*

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, 1 ml de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ , 2%) préparé dans l'éthanol (**Abdurrahman et al., 2013**).

Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de rutine préparées à des concentrations différentes. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 415 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent rutine/ gr de matière sèche (mg ER/g MS).

#### **I.2.4.1.3. Dosage des flavanols totaux (FLT)**

L'estimation de la teneur en flavanols totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de (Mbaebie, et al., 2012).

##### ➤ *Mode opératoire*

Un volume 400µl des extraits des feuilles a été ajouté à 400µlAlCl<sub>3</sub> (2%) dans 95% d'éthanol. La réaction précédente est mélangée avec 600 µl d'acétate de sodium (50g/l) et incubée pendant 2.5h à 20°C. L'absorbance est mesurée à 440 nm. La teneur totale en flavonols exprimée en mg équivalent quercétine (QE) / g de poids sec à l'aide de la courbe d'étalonnage (Scalbert., 1992).

#### **I.2.4.1.4. Dosage des tanins condensés (TC)**

##### ➤ *Principe*

Pour doser les tannins condensés, la méthode de la vanilline a été utilisée (Scalbert.,1992. Sun et al, 1998. Schofield et al.,2001).

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

##### ➤ *Mode opératoire*

50 µl d'extrait ou standard (catéchine) a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai de verre, et ajouté 600µl de mélange 4% vanilline et de méthanol (4%, v / v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 300µl d'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionnés. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesuré à 500 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La teneur totale en tanins condensés est calculée comme étant mg équivalent de catéchine (mg Ca E/g) en utilisant l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (Thomas et al.,2014).

#### **I.2.5. Evaluation de l'activité anti oxydante**

L'évaluation de l'activité anti-oxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité anti-oxydante trois techniques chimiques à savoir: capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

### I. 2.5.1. Activité antioxydante totale (TAC)

#### ➔ *Principe*

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (Belyagoubiet *al.*, 2012).

#### ➔ *Mode opératoire*

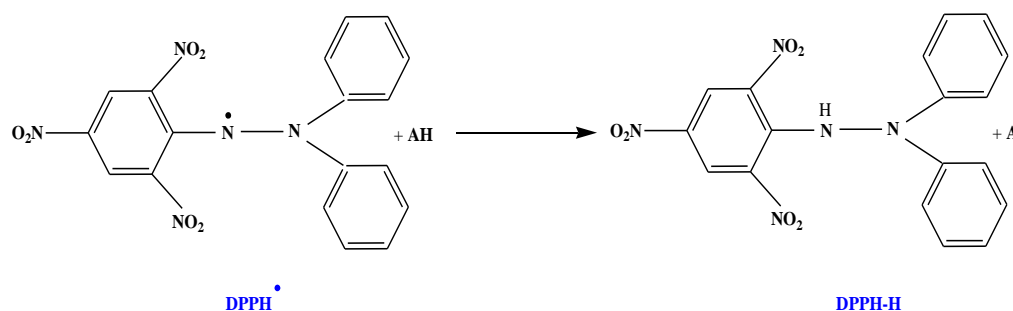
Un volume de 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait est mélangé avec 2 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 60 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 2ml de la solution du réactif et 200  $\mu\text{l}$  du solvant utilisé et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms) (Durre *et al.*, 2012).

### I. 2.5 .2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

#### ➔ *Principe*

L'activité anti radicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante (Brand-Williams., 1995).

Le DPPH (2,2 -diphényl -1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH. Cette couleur disparaît en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe pécryl; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno ., 2002). Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm (Gulcin *et al* 2003., Molyneux.,2004.Roginskyet *al* .,2005).



**Figure 21: Mécanisme d'action de DPPH.**

➔ **Mode opératoire**

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit: à 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.1mM) a été mélangé avec 0.5 ml de l'extrait des feuilles. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 515 nm contre un témoin composé de 1 ml de la solution de DPPH et de 0.5 ml de méthanol (Selma., 2012).

Les résultats exprimés en IC<sub>50</sub> qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici., 2009).

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Abs_{Control} - Abs_{Extrait}}{Abs_{Control}} * 100$$

Avec :

**Abs<sub>Control</sub>** : Absorbance du control (ne contenant aucun antioxydant).

**Abs<sub>Extrait</sub>** : Absorbance des extraits mesurés.

L'activité anti radicalaire exprimée en IC<sub>50</sub> (µg / ml), la dose anti radicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition.

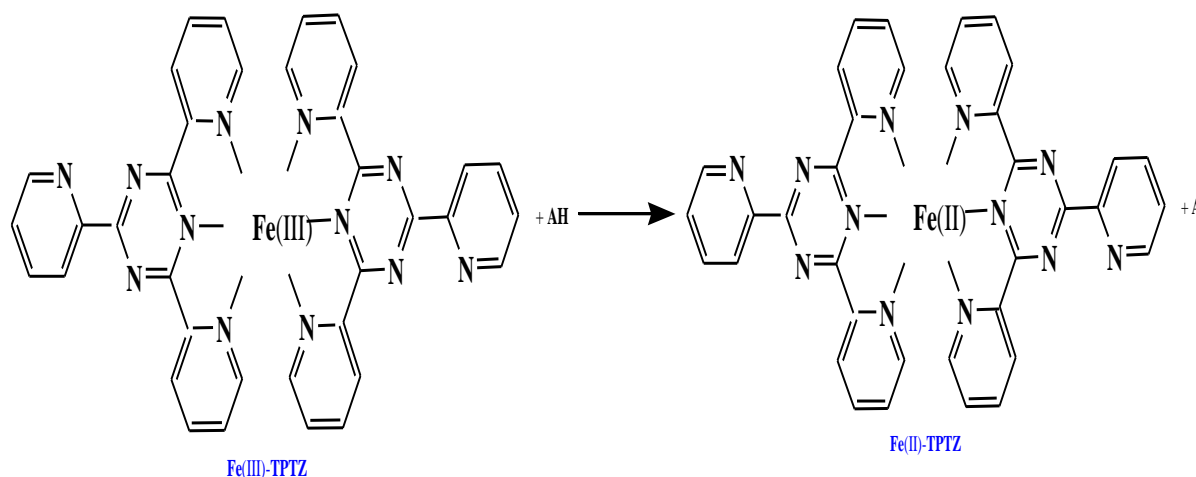
En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le %IC correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les %IC.

À partir de cette régression, nous avons déduit la valeur d'IC<sub>50</sub> correspondante.

## I.2.5.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

➔ *Principe*

La méthode FRAP est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un antioxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) à la couleur bleu-vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Le mécanisme réactionnel de la réduction de fer est expliqué dans la figure suivante (Djahra., 2013).



**Figure 22:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique  $\text{Fe}(\text{III})$ - TPTZ et un antioxydant (AH).

➔ *Mode opératoire*

La détermination de la capacité antioxydante par la méthode du FRAP est réalisée comme suit: le réactif FRAP était fraîchement préparée par mélange de 25mL d'une solution tampon d'acétate buffer (3mM, pH 3.6), 2,5mL de TPTZ (10 mM), 2,5mL du chlorure ferrique (20mM) et 3mL d'eau distillée. 30  $\mu\text{L}$  des différents échantillons d'essai ont été ajoutés à 970  $\mu\text{L}$  du FRAP réactif. L'absorbance a été lue à 593 nm après 30minutes d'incubation à température ambiante contre une vierge (Rivero., 2008). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de  $\text{FeSO}_4$  par 100mg de matière sèche (mg E  $\text{FeSO}_4$ /100mg Ms).

### I.2.5.4 .Application du test biologique (test hémolyse)

#### ➔ Principe

Le test hémolyse a été réalisé par méthode d'(**A birami et al. 2014**)Ce test permet de suivre l'évolution positive ou négative d'une prescription , sur l'état de défense de l'individu vis avis des radicaux libre) un globule rouge pour résiste à cette agression jusqu'à ce que la membrane soit modifié et que la cellule laisse échapper son contenu (**Maamri, 2008**).La lyse de cellule sanguine est induite par des générateurs de radicaux libres qui perturbent la membrane plasmique (peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ,trichlorure de FerFeCl<sub>3</sub> , acide ascorbique (**Chouikh, 2015**).

#### ➔ Mode opératoire

Le sang est récupère sur anticoagulant EDTA. Le sang est dilue 2fois dans l'eau physiologie. 20µl de globule rouge ajoute a 1ml d'extrait de, et laisse bandent 05min en 37° C après ajouter 20µl de solution peroxyde H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>(30mmol),20 µl de solution trichlorure de FerFeCl<sub>3</sub> (1%), 20µl solution acide ascorbique (50mmol ), le mélange place dans un bain marie a température 37°C ,après incubation 60 mn le mélange est centrifugé à 700tr/mn pendant 10 min. la longueur d'onde du spectrophotomètre est fixe à 540nm cette opératoire répète avec déférente concentration de extrait.

#### ➔ Courbe d'étalonnage

Pour tracer la courbe d'étalonnage en prenant l'acide ascorbique comme un standard à différentes concentrations (400- 1200 µg/ml), dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions des échantillons.

Les résultats du test d'hémolyse sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la lyse des globules rouge. Le pouvoir d'inhibition a été calculé à partir de la relation suivante :

$$\% \text{ hémolyse} = [\text{ABS}_{\text{contrôle}} / \text{ABS}_{\text{echantillon}}] * 100$$

**ABS**<sub>contrôle</sub>: Absorbance de milieu réactionnelle en présence de l'extrait.

**ABS**<sub>echantillon</sub>: Absorbance de milieu réactionnelle en absence de l'extrait (**chouikh, 2015**).

**I.2.6. L'évaluation de l'activité antifongique :**

Les propriétés antifongiques des feuilles de *Vitis vinifera* ont été vérifiées sur les champignons *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.

↳ Pour mieux évaluer cette activité nous avons opté la méthode de diffusion en milieu gélosé (l'antifongigramme).

↳ Pour détermination le CMI par deux méthodes :

❖ par méthode de contact direct en milieu solide : pour les moisissures.

❖ par méthode du macro dilution en milieu liquide : pour les levures.

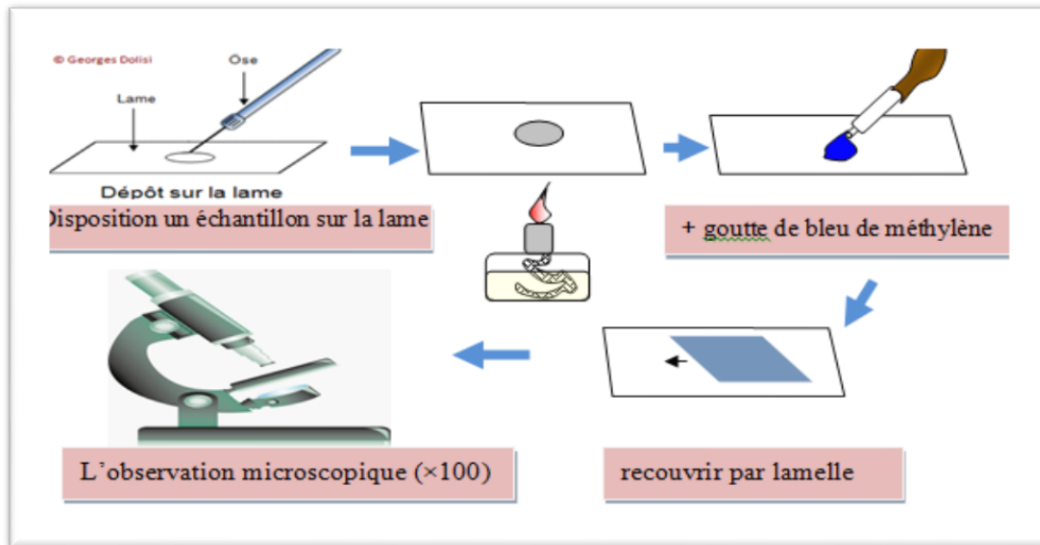
**I.2.6.1. Test identification des souches fongiques :****I.2.6.1.1. Identification des levures :****A. Test de blastèse**

Les souches à tester estensemencée dans 1mL de sérum humain, puis incubée à 37°C pendant 3 à 4 heures. L'observation de la suspension au microscope optique **ZEISS** (Grossissement ×100) est réalisée pour mettre en évidence la formation des tubes germinatifs (**Bouchet et al., 1989**) Seul l'espèce *Candida albicans* filamente sur sérum.

**II-2-6-1-2. Identification des moisissures****B. Observation microscopique**

A partir d'une culture sur milieu gélosé on prélève un échantillon à l'aide d'une pipette Pasteur et déposer sur la lame, puis recouvrir par lamelle sur laquelle est préalablement étalée une goutte de bleu de méthylène, ensuite on a examiné la lame sous microscope optique **ZEISS** au grossissement (X100) (**Cahagnier et al., 1998**).

Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur les types de spores.

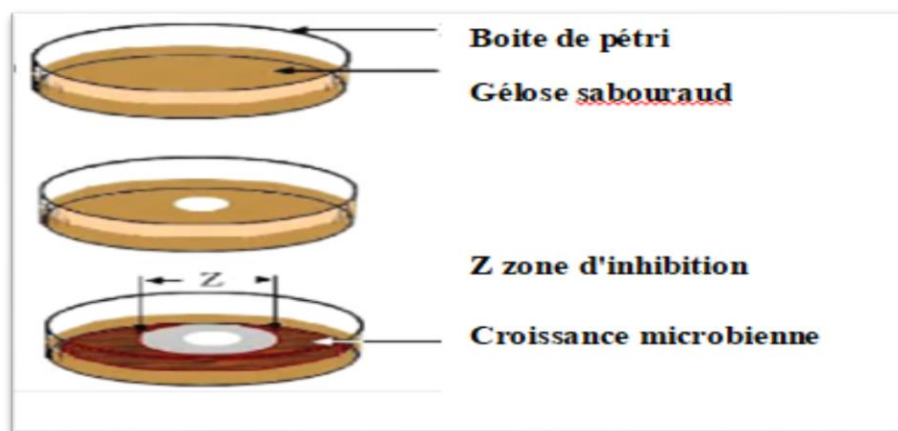


**Figure 23** : Identification des moisissures par observation microscopique

Cette méthode de est préconisée par (carson et al., 1995 et cavallo et al., 2006).

➔ **Principe :**

L'antifongique présent dans le disque migre dans la gélose qui a étéensemencée par la souche fongique à étudier. Il se forme une zone circulaire autour du disque de gélose imbibée d'antifongique dont la concentration décroît quand on s'éloigne du disque. Dans cette zone, la croissance des champignons est ou ne sont pas inhibée par la concentration d'antifongique à laquelle elles sont soumises. Les souches fongiques qui peuvent se multiplier forment des colonies visibles à l'œil nu après quelques jours de développement (Broadasky et al., 1976).



**Figure24** : Méthode de diffusion sur milieu gélosé.

**➔ Mode opératoire :**

Mode opératoire est résumé dans les étapes suivantes :

**• Préparation des extraits à tester :**

Les extraits des feuilles de *Vitis vinifera* sont dissous dans le DMSO pour préparer des solutions de concentrations de 5, 10, 20, 50 mg/ml.

**• Préparation des précultures:**

Les souches fongiques à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant du milieu de sabouraud et incubé pendant 7 jours à 25°C afin d'obtenir une culture jeune des champignons et des colonies isolées.

**• Préparation des disques:**

Les disques sont préparés à partir du papier wattman N° 3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai pour la stérilisation.

**• Stérilisation des matériels:**

Le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions fongiques, les disques en papier wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C. Pendant 45 minutes.

**• Préparation des boîtes de gélose.****↪ Préparation zone stérile:**

- Désinfecter la paillasse à l'eau de javel diluée.
- Utiliser un bec bunsen pour réaliser une zone stérile.

↪ **Couler la gélose dans les boîtes :** Couler la gélose dans les boîtes organisées dans la zone stérile limitée aux 15 cm autour du bec. (20 à 25 ml par boîte soit une hauteur de 3 à 4 mm). Laisser refroidir couvercle entre-ouvert pour éliminer la vapeur d'eau Jusqu'à le refroidissement et solidification du milieu de culture sur les boîtes.

**• Préparation des suspensions fongiques;**

A l'aide d'une pipette pasteur nous avons prélevée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et sont été mises dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel(Na Cl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée et laisser sur la paillasse pendant 30 minute (**OMS, 2005**).

Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. La D.O doit être comprise entre 0.12et0.15 l'équivalent de  $10^8$  CFU / ml.

• **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de pétri, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière avec la gélose sabouraud à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

• **Application des disques**

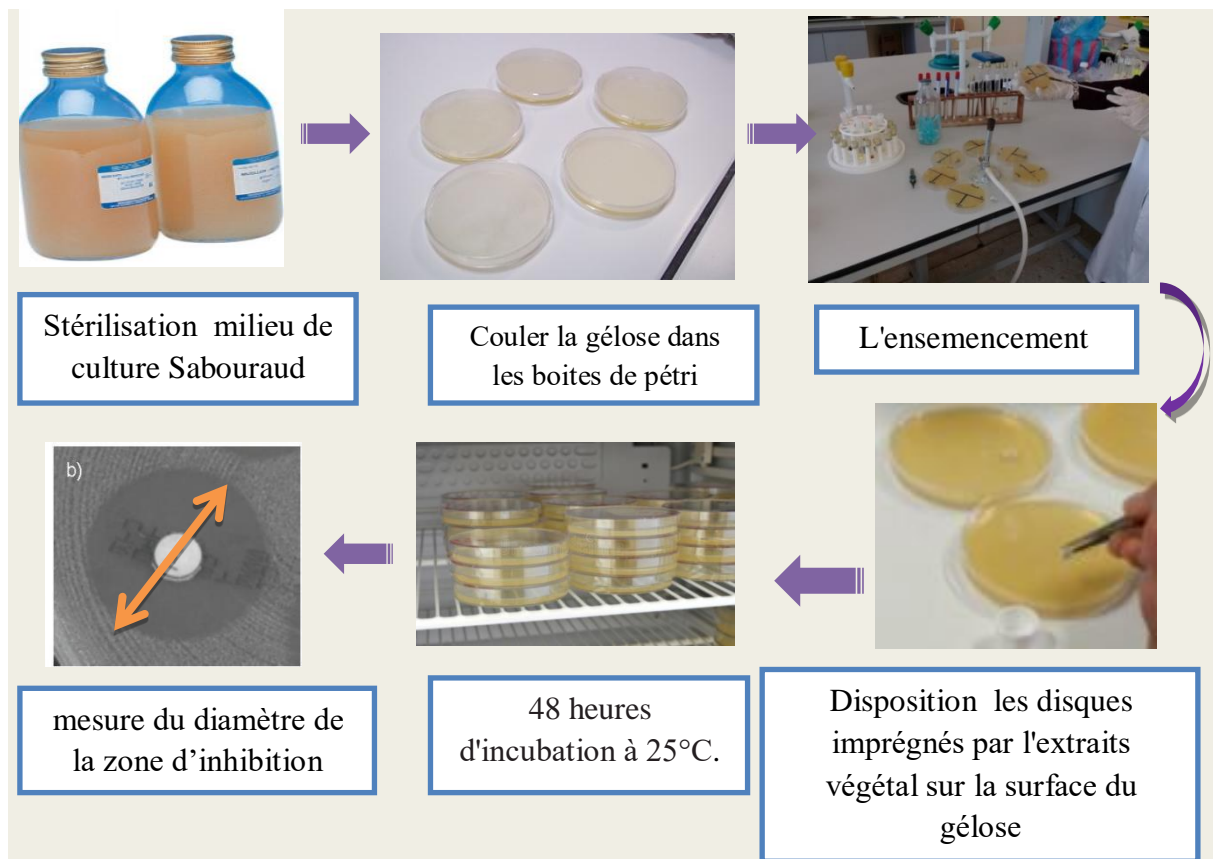
Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

• **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en mm après 2 jours d'incubation à  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

• **Evaluation de zone d'inhibition**

La zone d'inhibition a été évaluée par mesure la moyenne de trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche.



**Figure25:** les étapes de méthode de diffusion sur milieu gélosé.

### I.2.6.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI):

Selon (Dramane et al., 2010), les extraits dont la zone d'inhibition a un diamètre supérieur ou égal à 10 mm, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

#### I.2.6.3.1.Détermination (CMI) sur milieu liquide par méthode du macrodilution:

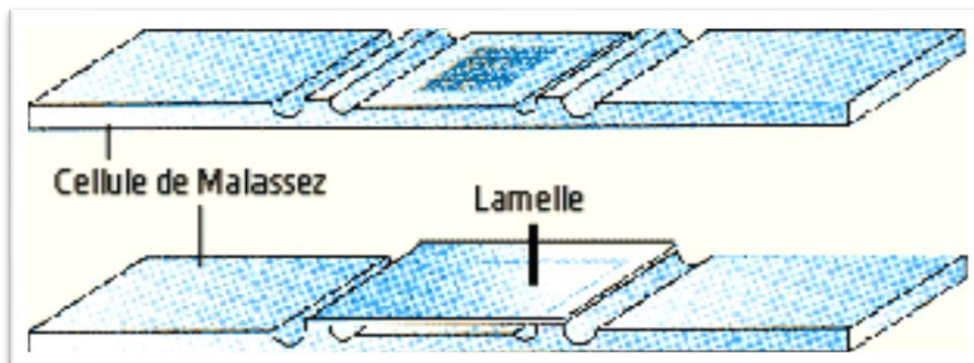
##### ➔ Principe :

Cette technique consiste à inoculer, par une suspension levurique standardisée, une gamme de concentration décroissante en extrait végétal. Après incubation, l'étude de la gamme permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) relative à chaque extrait, qui est déterminée comme étant la plus faible concentration de l'extrait qui inhibe plus de 70% la croissance du champignon testé (M. Zuzarte et al ,2013)

##### ➔ Mode opératoire

#### 1. Préparation de l'inoculum fongique :

Les suspensions mères des levures sont préparées à partir d'une culture des différentes souches sur milieu Sabouraud qui est préparé précédemment. Sur la paroi d'un tube à hémolyse contenant 5 ml de sérum glycosé à 5%, on écrase une colonie de levures mesurant 1,5 à 3 mm de diamètre, prélevée de la culture par pipette Pasteur stérile. Les suspensions sont préparées dans le sérum glycosé à 5% et ajustées à  $2.10^3$  levures/mm<sup>3</sup> après comptage à la cellule de malassez.



*Figure26* : la cellule de malassez.

250 mg d'extraits des feuilles de *Vitis vinifera* à tester sont placés dans un tube à essai contenant 5 ml de DMSO à 10%, puis homogénéisés par agitation manuelle. Une dilution en cascade est effectuée dans le DMSO à 10%, de manière à obtenir une gamme de concentration décroissante de 50, 20, 15, 10, 8, 5, 1 mg/ml. (**Figure 27.A**).

À partir des différents tubes de la gamme, nous prélevons 20 µL qu'on rajoute à 200 µL d'inoculum fongique, de densité équivalente à  $2 \cdot 10^3$  levures. $\text{mm}^{-3}$ , distribués dans une série de tubes à hémolyse. Après homogénéisation manuelle, les tubes sont complétés par la quantité suffisante de sérum glycosé 5% pour avoir un volume final de 1 ml pour chaque tube. Un témoin de la croissance fongique, pour lequel 200 µL de l'inoculum ont été additionnés de 800 µL du sérum glycosé 5%, est également préparé.

L'ensemble des tubes à hémolyse, hermétiquement fermés, sont incubés à  $(25 \pm 2)$  °C pendant 48 heures (**Figure 27.B**).

Après incubation, les tubes sont quantifiés à la cellule de Malassez puis le taux d'inhibition de chaque concentration de la gamme est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition en (\%)} = [1 - (T_{48 \text{ extrait}} - T_0) / (T_{48 \text{ témoin}} - T_0)] * 100.$$

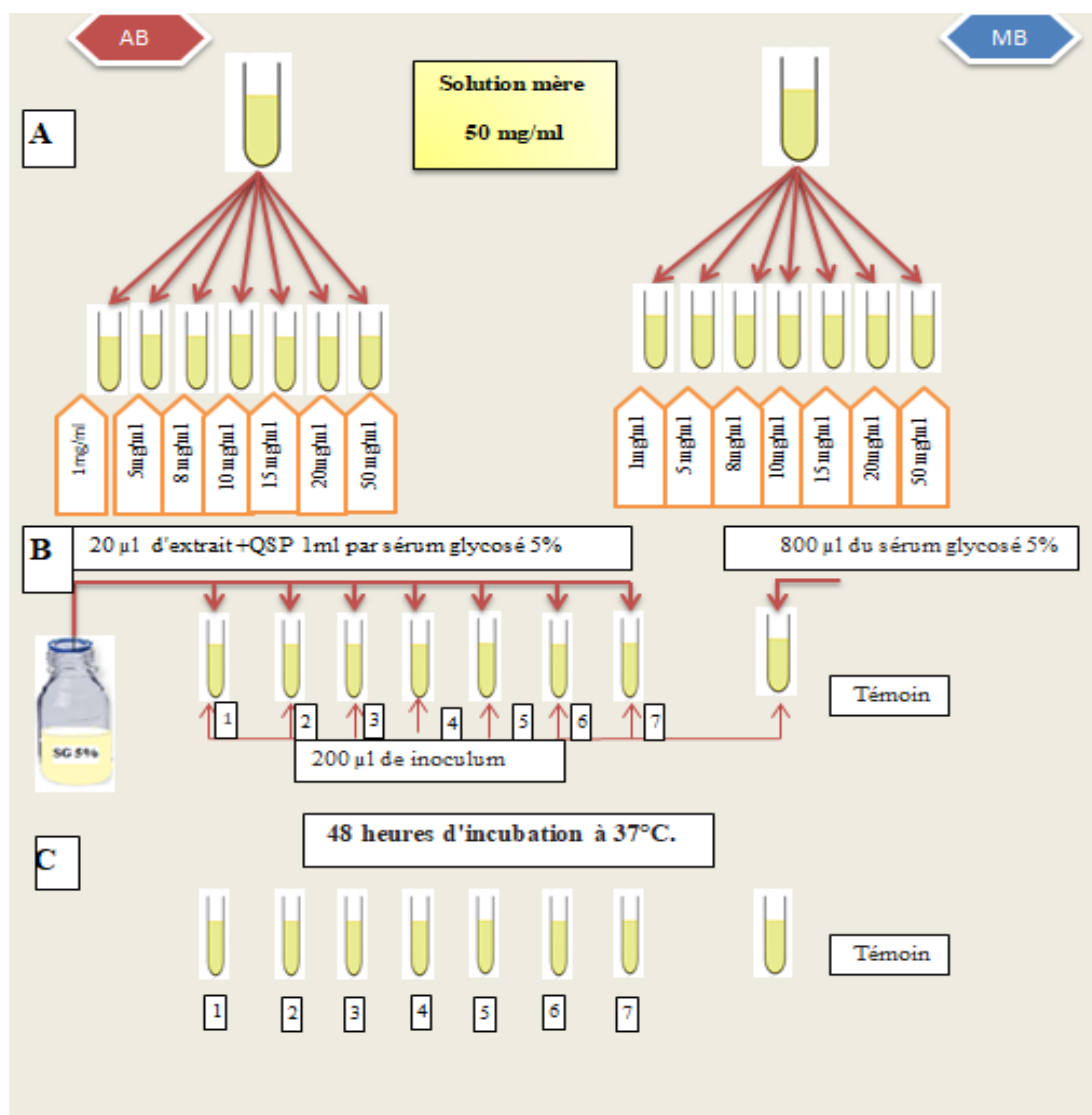
Où:

$T_0$  : nombre de levures dans le tube témoin à temps zéro.

$T_{48 \text{ témoin}}$  : nombre de levures dans le tube témoin après 48h d'incubation.

$T_{48 \text{ extrait}}$  : nombre de levures dans le tube avec extrait testé, après 48h d'incubation.

La CMI d'extraits des feuilles de *vitis vinifera* est alors déterminée comme étant la faible concentration capable d'inhiber à plus de 70% la croissance du champignon étudié (**Figure 27.c**).



**Figure 27 :** Méthode de préparation de la gamme décroissante d'extraits des feuilles de *Vitis vinifera* pour déterminer la CMI en milieu liquide.

### I.2.6. 3.2. Détermination (CMI) par méthodes de contact direct en milieu solide

#### ➔ Principe :

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu solide par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de (Fandohan et al, 2012).

Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu Sabouraud.

**➔ Mode opératoire:**

A partir des différents tubes de la gamme de concentration croissante de l'extrait végétal numéroté de 1, 5, 8, 10, 15, 20, 50 mg/ml. Nous prélevons 500µL est incorporée séparément dans des tubes contenant 20ml du milieu Sabouraud maintenu en surfusion. Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est coulé dans une boîte de pétri. Un disque mycélien de 6 mm de diamètre prélevé de la culture jeune du mycète a été inoculé.

**• Lecture :**

La lecture des résultats a été effectuées après 2 jours d'incubation à (25±2) °C par mesure du diamètre de la zone de croissance. Parallèlement, nous avons déterminé le diamètre de la zone de croissance de ces mêmes souches fongiques en absence d'extrait.

**• Calcul le Taux d'inhibition :**

L'effet antimicrobien des extraits sur la croissance des souches filamenteuses est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule **d'Ebbot**:

$$T \text{ en } (\%) = (D_k - D_0) / D_k \times 100$$

**D<sub>k</sub>**: Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm).

**D<sub>0</sub>**: Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm).

**T** : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

**Analyses statistiques**

Dans cette étude nous avons utilisé le test statistique ANOVA à un facteur, sans répétition pour analyser l'effet de séchage par le logiciel MINITAB 2017. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. Ce test nous donne le degré de signification

**P** où on dit que la différence : Différence non significative  $P > 0.05$ . Différence significative  $P < 0.05$ . Différence hautement significative  $P < 0.01$ . Différence très hautement significative  $P < 0.001$ .

Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition=f (concentration)].

# ***CHAPITRE II***

## **Résultats et Discussion**

## II. Résultats et Discussion

### II.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques :

Le rendement d'extraits de feuilles des deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera* est calculé selon la règle générale (Falleh *et al* 2008).

$$\text{rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de residu extrait}}{\text{Masse initial de végétale}} * 100$$

Le rendement des différents extraits sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 12 :** Rendements des extrait de feuilles des deux variétés **AB** et **MB** exprimé(%).

La variété	Le rendement en (%)
<b>AB</b>	<b>23.01%</b>
<b>MB</b>	<b>12.33%</b>

### II.2. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans les feuilles des deux variétés de *Vitis vinifera* par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Les résultats des tests phytochimiques ont été réalisés sur les feuilles des deux variétés de *Vitis vinifera* sont présentés dans le tableau (13):

**Tableau 13** : les résultats des tests phytochimiques les feuilles de deux variétés de *Vitis vinifera*.

La classe recherchée	Les Résultats obtenus	
	AB	MB
<i>polyphenols</i>	+++	+++
<i>flavonoïdes</i>	+++	+++
<i>tannins</i>	+++	+++
<i>saponines</i>	-	-
<i>terpenoïdes</i>	++	++
<i>alcaloïdes</i>	-	-
<i>sucres réducteurs</i>	++	++

(+++) : Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des composés réducteurs et des polyphenols, des flavonoïdes, des tanins et des triterpènes en quantités importantes. Nous observons aussi l'absence des alcaloïdes et des saponines dans nos extraits.

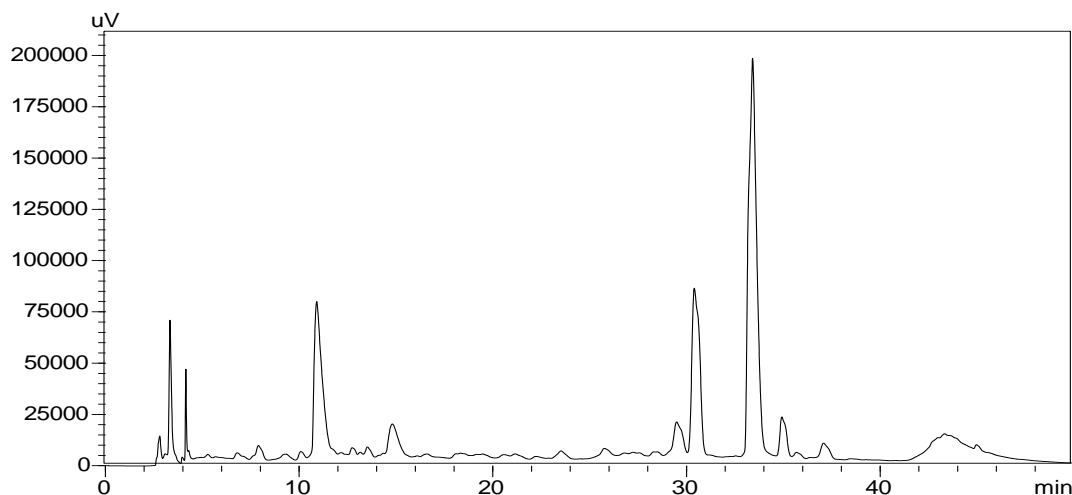
### II.3. L'Analyse par HPLC des composés phénoliques

Les différents extraits d'espèce *Vitis vinifera* ont été analysés afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la composition de ces extraits en polyphénols et leurs compares avec les différents standards des étalons utilisé (acide gallique, acide chlorogénique, l'acide vanilique, acide caféique, vanilline, rutine, naringine et quercitine).

La quantité de ces composés a été rapportée en microgramme par un milligramme de la matière végétale équivalente en solution standard.

### II.3.1. Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de la variété MB :

Les résultats de la séparation d'extrait des feuilles de la variété **MB** par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants :

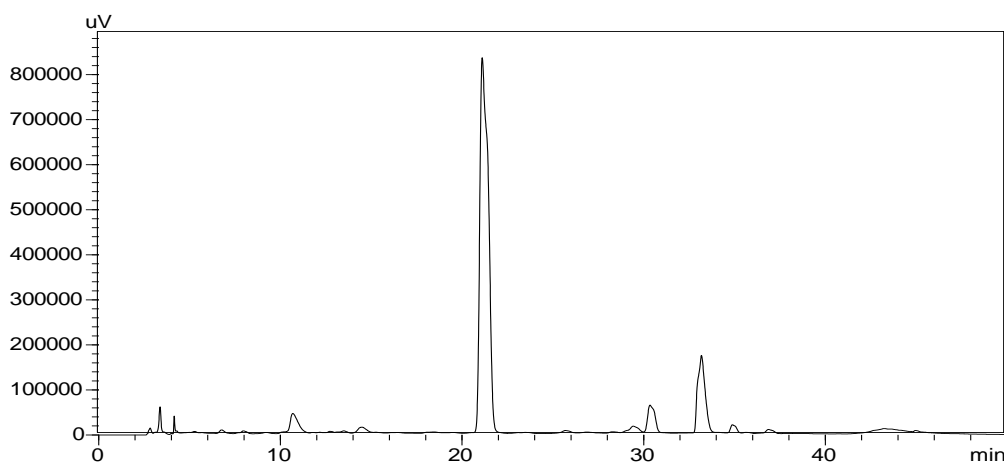


**Figure 28** : profil chromatographique HPLC d'extrait des feuilles de la variété **MB**.

L'analyse de les résultats obtenus montre la présence de: l'acide gallique (0.21  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), l'acide chlorogénique (0.368  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), l'acide vanillique (1.16  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), l'acide caféique (0.08  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), vanilline (0.1903  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms) l'acide coumarique (0.279  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), et la rutine ( 0.223  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms), naringine ( 1.767  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms) et quercitine (0.58  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Ms),.On a remarqué que la naringine représente le composé majoritaire .

### II.3.2. Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de la variété AB :

Les résultats de la séparation d'extrait des feuilles de la variété **AB** par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants :



**Figure 29** : profil chromatographique HPLC d'extrait des feuilles de la variété **AB**.

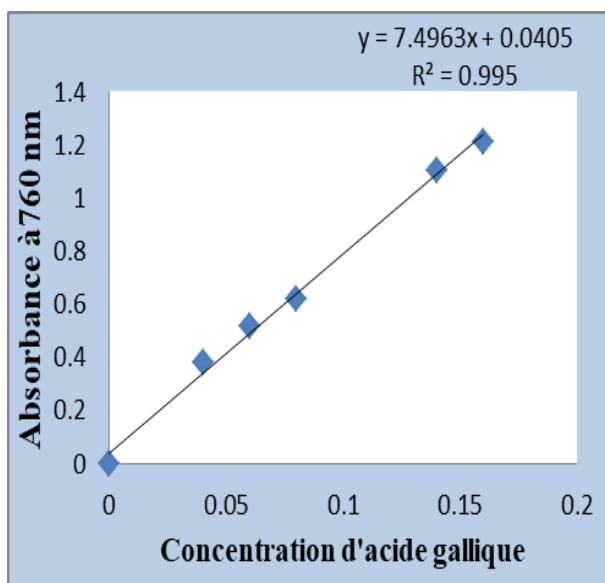
Le profil chromatographique d'extrait des feuilles de la variété **AB** est représenté au niveau de la figure 29.

L'analyse des résultats obtenus montre la présence de: l'acide gallique (0.3202 µg/ mg Ms), l'acide chlorogénique (0.402 µg/ mg Ms), l'acide vanillique (0.284 µg/ mg Ms), l'acide caféique (0.1313 µg/ mg Ms), vanilline (46.4003µg/ mg Ms), l'acide coumarique (0.4095 µg/ mg Ms), la rutine ( 0.74206 µg/ mg Ms), le naringine ( 1.8399 µg/ mg Ms) et quercétine (1.1965 µg/ mg Ms). On remarque que la vanilline représente le composé majoritaire .

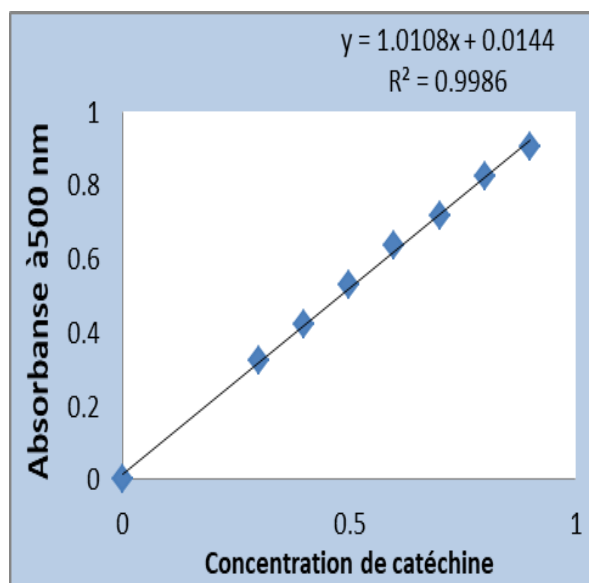
Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque des étalons adéquats.

#### **II.4. Analyse quantitative des composés phénoliques par les méthodes colorimétriques :**

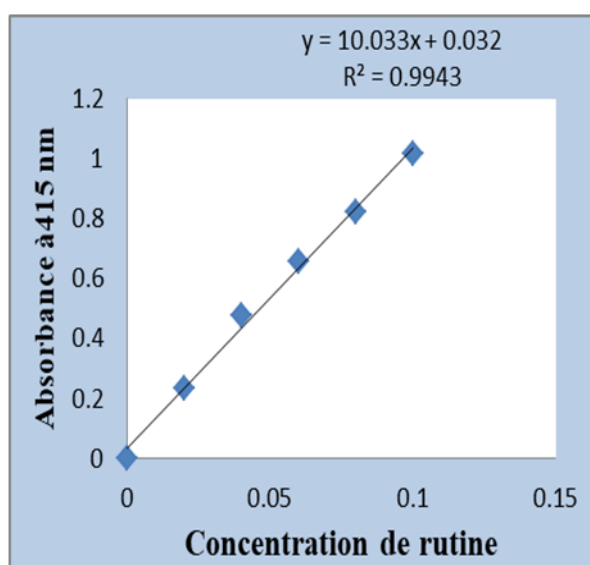
Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des flavanols et des tannins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique, rutine, quercétine et de la catéchine par g de la matière sèche (**figures 30, 31, 32 et 33**).



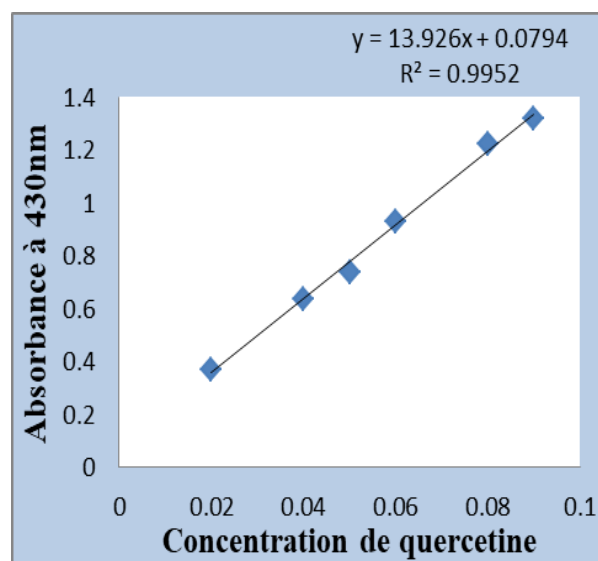
**Figure 30 :** Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique pour le dosage des polyphénols totaux (PPT).



**Figure 31 :** Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des des tanins condensés (TC).

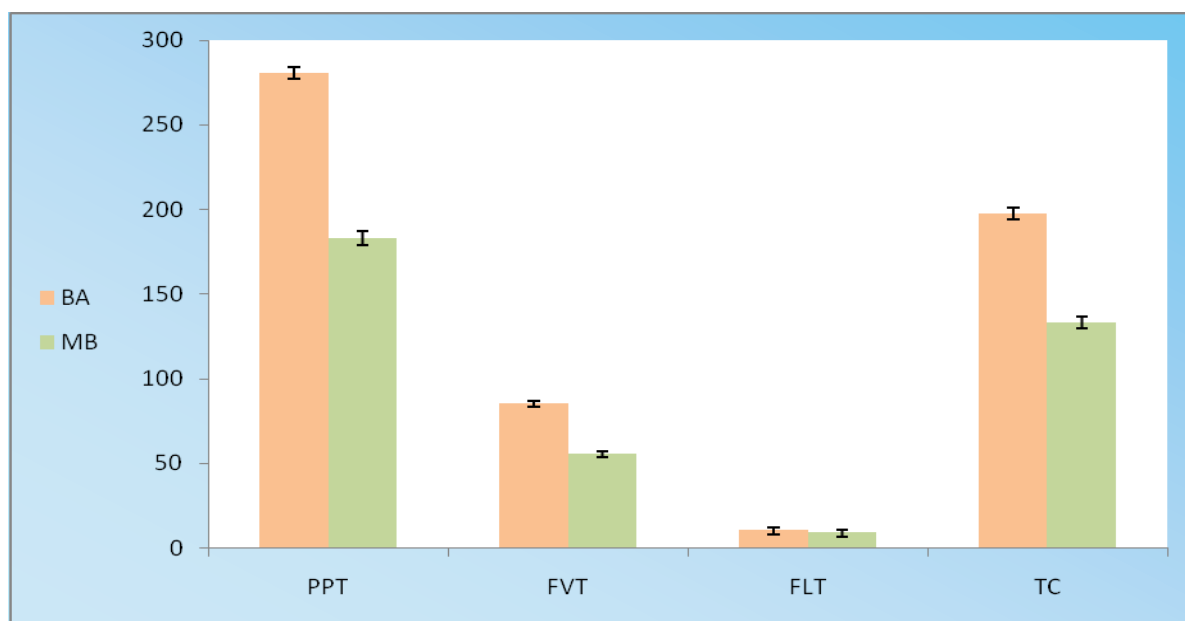


**Figure 32 :** Courbe d'étalonnage de rutin pour le dosage des totaux flavonoïdes (FVT).



**Figure 33 :** Courbe d'étalonnage de quercetine pour le dosage des flavanols totaux (FLT).

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en flavanols et des tanins condensés des nos extraits hydrométhanoliques sont représentés dans la figure 34.



**Figure 34 :** Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, flavanols et tannins des deux extraits AB et MB.

#### II.4. 1. Teneur en polyphénols totaux(PPT) :

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent milligramme d'acide gallique par g de la matière sèche, et déterminé par l'équation de type :  $y = 7.4963x - 0.0405$  sachant que  $R^2 = 0.995$ . (Fig. 30).

Les teneurs en polyphénols totaux (Fig. 34) des extraits des feuilles des deux variétés de *Vitis vinifera* étudiées **AB** et **MB** sont de l'ordre ( $280.86 \pm 1.25$  et  $183.05 \pm 1.66$  mg EAG/g MS) respectivement.

#### II.4. 2. Teneur en flavonoïdes totaux (FVT):

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et l'utilisant de la rutine comme étalon (Fig. 32). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de rutine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS). Les taux des flavonoïdes des deux extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type :  $y = 10.033x + 0.032$  sachant que  $R^2 = 0,9992$ .

Les teneurs en flavonoïdes totaux (Fig. 34) des extraits des feuilles des deux variétés de *vitis vinifera* étudiées **AB** et **MB** sont de l'ordre ( $85.609 \pm 0.12$  et  $55.633 \pm 0.272$  mg re /gMS) respectivement.

Ces résultats concordent avec les travaux réalisés ultérieurement ; ceux obtenus par (**Alexandra et al., 2017**) montrent des teneurs en flavonoïdes des quelques variétés de *vitis vinifera* ont varié entre ( $85.6 \pm 1.45$  et  $55.3 \pm 1.03$  mg re /g MS).

#### II.4. 3. Teneurs en flavonols totaux (FLT):

La quercétine a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS). Le taux des flavonols des deux extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage (Fig. 33) qui suit une équation de type :  $y = 13.926 x + 0.0794$  sachant que  $R^2 = 0,9952$ .

Les teneurs en flavonols (Fig. 34) des extraits hydrométhanoliques **AB** et **MB** sont  $10.297 \pm 0.582$  mg EQ /g MS et  $8.728 \pm 0.433$  mg EQ /g MS respectivement.

#### II.4. 4. Teneurs des tanins condensés (TC):

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode de la vanilline en milieu acide. La teneur en tanins est exprimée en milligramme d'équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg ECa/g MS). Les taux des tanins des extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type:  $y = 1.0108x - 0.0144$  sachant que  $R^2 = 0,9986$ .

Les teneurs en tanins condensés (Fig. 34) des extraits des feuilles des deux variétés de *vitis vinifera* étudiées **AB** et **MB** sont de l'ordre ( $197.57 \pm 3.31$  et  $133.066 \pm 3.41$  mg ECa/g MS) respectivement.

### II.5. Discussion

Les variations des rendements d'extraction peuvent être attribuées à la différence de solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction. D'ailleurs, le degré de polymérisation de ces composés et leurs implications dans d'autres structures moléculaires induits à la formation des complexes insolubles **Falleh et al (2008)**.

La méthode d'extraction de polyphénols doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (**Sun et al., 2005**).

Avec la méthode d'extraction par macération où on a utilisé le méthanol, solvant le plus recommandé pour extraire le maximum de composés phénoliques, possède l'avantage d'être éliminé facilement (**Ribéreau-Gayon, 1972**). Selon (**Falleh et al., 2008**), le méthanol est le solvant approprié pour obtenue maximum récupération des polyphénols, est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires.

Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**). Les études précédentes montrent que le méthanol un des solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (**Benbrinis, 2012**) et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante (**Barros et al., 2010**). Ce solvant a été utilisé dans cette étude pour obtenir les extraits à partir des feuilles de deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera*.

les variations quantitative et qualitative du contenu polyphénolique entre les deux plantes étudiées peuvent être liées aux facteurs climatiques et environnementaux comme la zone géographique, la sécheresse, le sol, les maladies (**Ebrahimi et al., 2008**) et la période de récolte.

Selon (**Hayouni et al., 2007**), La variabilité des teneurs en polyphénols chez les espèces végétales est dû probablement à la composition phénoliques des extraits , aux facteurs génotypiques (**El-Waziry., 2007**), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**).

Selon **Djeridane et al, (2005)**, la teneur des métabolites secondaires de la plante peut changer ; en raison de l'existence d'une liaison avec les conditions climatiques défavorables et les conditions de collections telles que les températures élevées, la durée d'exposition solaire, la nature du sol et la saison de croissance .En plus l'organe analysé, la région, la date de la récolte et le degré de maturité.

## II.6. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante des différents extraits de la plante testée a été réalisée par quatre méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer (FRAP) et le test d'hémolyse.

### II.6. 1. La capacité antioxydante totale (CAT):

La capacité antioxydante totale (CAT) est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms). Le taux de capacité antioxydante totale des extraits a été obtenu à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide gallique ayant l'équation :  $y = 2.905x + 0.0175$  avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.9934$ .

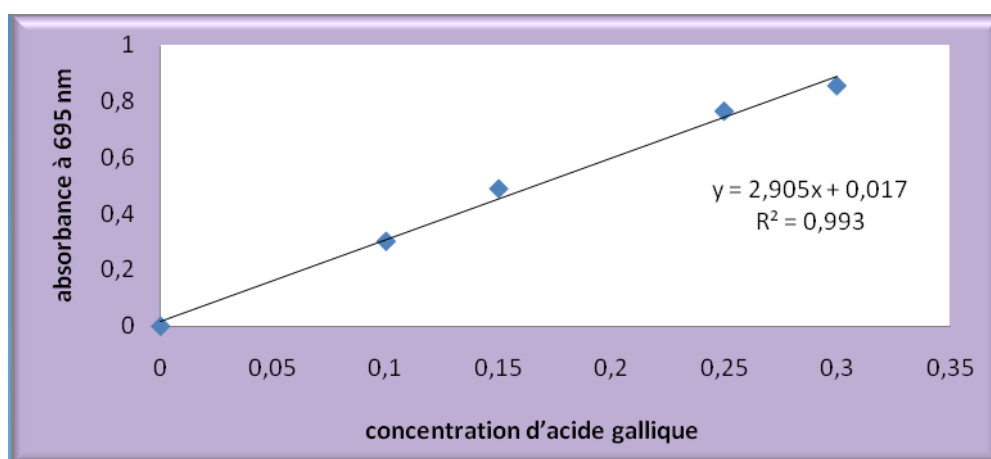


Figure 35 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique de test CAT.

Nos résultats sont présentés dans la figure (36).

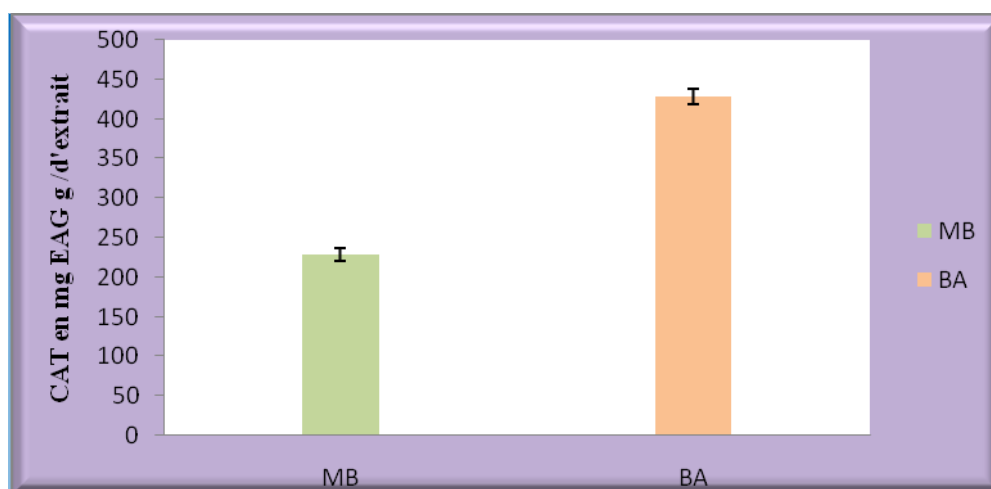


Figure 36 : Variation de la capacité antioxydante totale des deux plantes AB et MB.

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits présentent des activités antioxydantes différentes. L'extrait des feuilles de la variété **AB** possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de  $(428.23 \pm 10.13 \text{ mg EAG/g Ms})$  que L'extrait des feuilles de la variété **MB** qui révèlent une capacité antioxydante totale de l'ordre de  $(227.88 \pm 8.13 \text{ mg EAG/g Ms})$ .

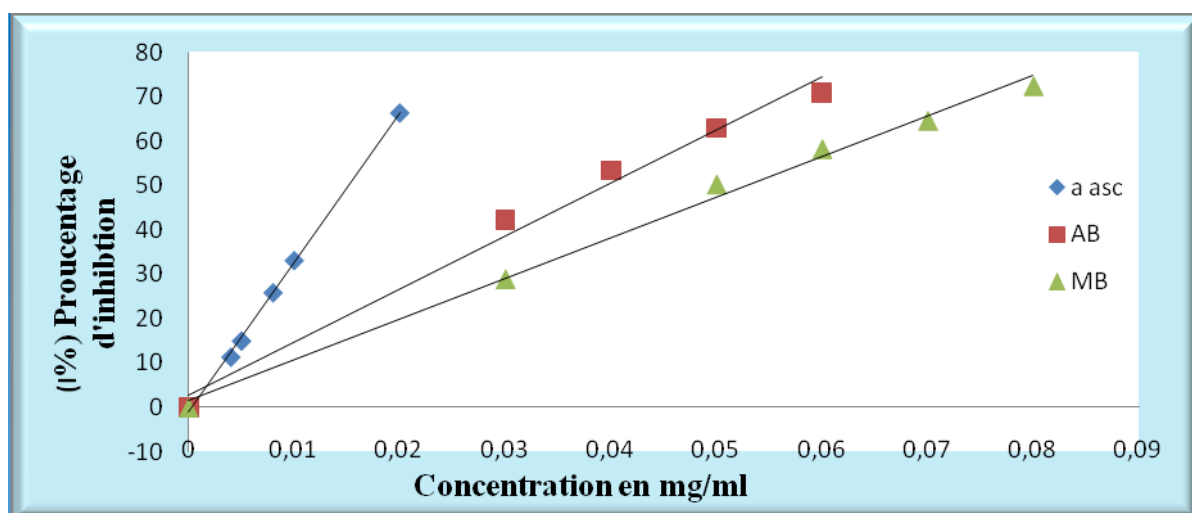
Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par (**Alexandra et al, 2017**) qui ont trouvé que la capacité antioxydante totale de quelques variété d'espèce *vitis vinifera* varié entre  $(429.3 \pm 11.1 \text{ mg EAG/g Ms}$ ,  $261.9 \pm 17.05 \text{ mg EAG/g Ms}$  et  $179.0 \pm 4.97 \text{ mg EAG/g Ms}$ ).

### II.6.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

L'activité antioxydante des extraits de feuilles des deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *vitis vinifera* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (**Majhenic et al, 2007**).

Les capacités antioxydantes des extraits des deux plantes étudiées ont été déterminées et comparées à l'activité de composé anti-radicalaire acide ascorbique comme référence.

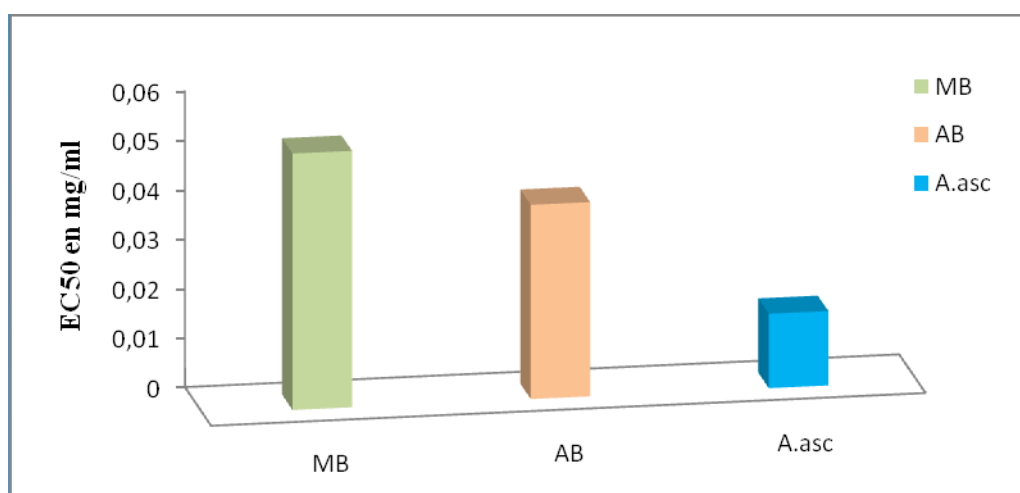
Les résultats obtenus sont représentés la figure 37.



**Figure 37 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des différents extraits des feuilles de *Vitis vinifera* et d'acide ascorbique.

Les résultats obtenus pour le test de DPPH, exprimés en termes de concentration inhibitrice de 50 % des radicaux (IC<sub>50</sub>). Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité du radical DPPH (couleur). (Abdulmajed *et al.*, 2005). Ces IC<sub>50</sub> sont déterminées à partir de graphe de Figure (37).

La variabilité de l'activité anti radicalaire chez *Vitis vinifera* trouvée pour tous les extraits testés et l'acide ascorbique sont indiquées dans la figure (38) sous forme d'histogramme.



**Figure 38 :** Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC 50 des différents extraits et d'acide Ascorbique en mg/ml.

Les résultats révèlent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire vers le DPPH.

Les résultats montrent que l'acide ascorbique a une activité antiradicalaire très puissante avec IC<sub>50</sub> d'ordre 0,0142 mg/ml. Par ailleurs, les extraits **AB** et **MB** ont montré les activités antiradicalaires les plus faibles que l'étalon en affichant les IC<sub>50</sub> les plus fortes de l'ordre de 0,0373 et 0,05 mg/ml respectivement.

D'une manière générale, notre espèce possède une activité antioxydante moins que celle de l'acide ascorbique qui est considérée comme un antioxydant puissant.

Les capacités des extraits naturelles à piéger les radicaux libres, dépendent d'un certain nombre des paramètres ; la dose, la structure, les substituant et le degré de polymérisation de la molécule (Mohammedi, 2013).

Cette activité peut être due à la richesse de ces extraits en composés phénoliques (Ahrizat et Sobti, 2016). En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydants ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Javanovic et al. 1994).

(HUA et al, 2008) ont trouvé une valeur d'IC<sub>50</sub> de 0.0422 mg/ml en étudiant l'effet antioxydant des feuilles d'espèce *Vitis vinifera* de (chine), ce qui est inférieur au pouvoir antioxydant de la variété AB et supérieur que la variété MB d'espèce *Vitis vinifera*. D'autre part à comparer avec autre variété de *Vitis vinifera* (Didem et al. 2008) ils trouvent une valeur d'IC<sub>50</sub> de 13.13 mg/ml ce qui est supérieur par rapport à notre étude.

### II.6.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power):

Le test de FRAP permet de définir la capacité d'un antioxydant à inhiber l'initiation des réactions radicalaires par les ions métalliques. Pour chaque extrait, une concentration a été testée (0.5 mg/ml) et l'absorbance lue à 593 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de FeSO<sub>4</sub> par 100mg de matière sèche (mg E FeSO<sub>4</sub>/100mg Ms).

Cette capacités antioxydantes des extraits de plante étudiée ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique suit une équation de type :  $y = 1.0108x + 0.0144$  sachant que  $R^2 = 0.9986$  (figure 39).

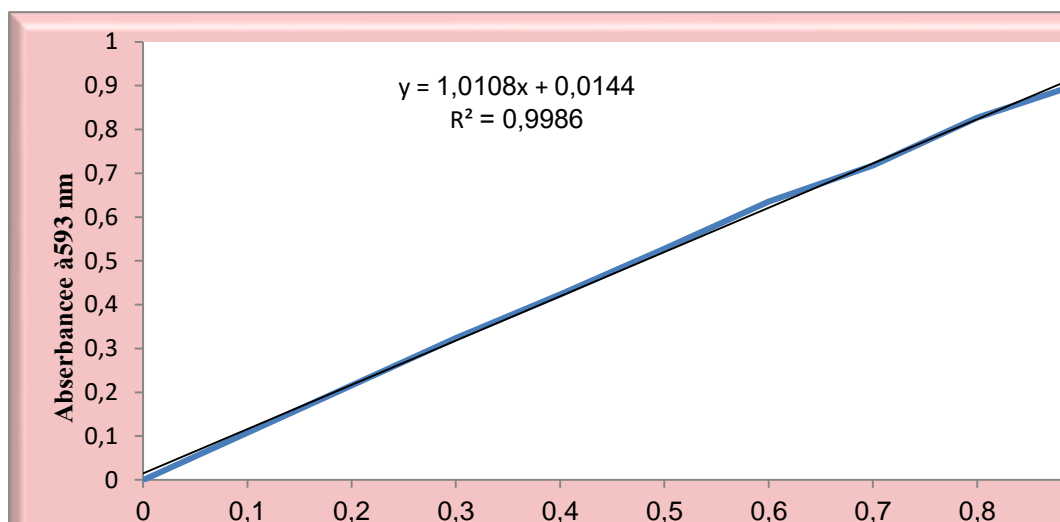
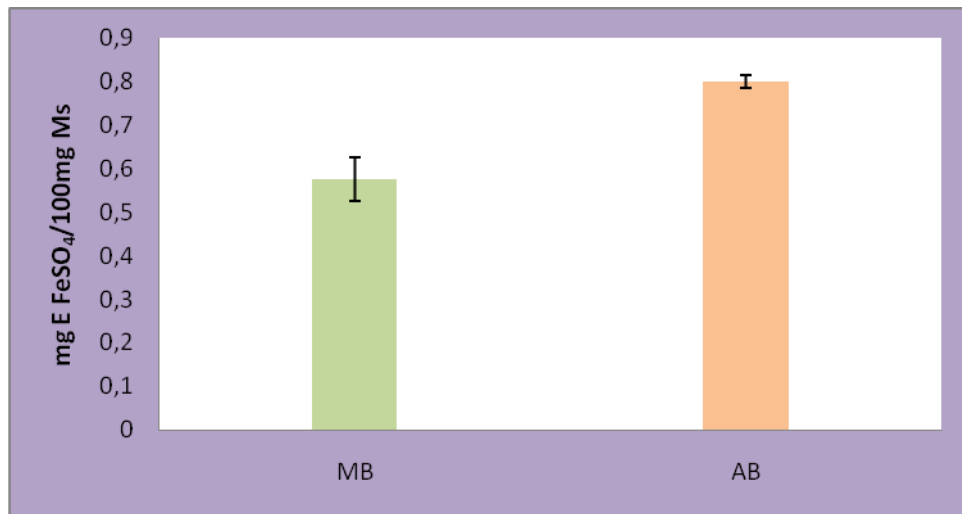


Figure 39: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique pour le test de FRAP.

Les résultats de l'activité réductrice de l'ion ferrique des nos extraits sont représentés dans la figure (40).



**Figure 40 :** Pouvoir réducteur des extraits **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera*.

D'après l'histogramme illustré dans la figure 40, on remarque une variabilité de pouvoir réducteur entre les deux extraits de la plante étudiée, on trouve que la grande valeur est enregistrée à l'extrait AB ( $0.8007 \pm 0.0148$  mg E FeSO<sub>4</sub>/100mg Ms), D'ailleurs, l'extrait MB possède une valeur de l'ordre ( $0.5757 \pm 0.0514$  mg E FeSO<sub>4</sub>/100mg Ms). On constate que l'extrait de la plante AB possède une bonne action vis-à-vis de Fe<sup>3+</sup> présent dans la solution testée largement supérieure par rapport l'extrait de la plante MB.

Cette variabilité de ses propriétés à cause de la quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes dans nos extraits qui peut jouer un rôle majeur dans l'inhibition antioxydante. Ainsi, l'activité prooxydante de ces substances est le résultat de leur capacité à réduire les métaux comme le Fe<sub>+3</sub> pour donner Fe<sub>+2</sub> lequel réagira avec O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec génération d'initiateurs de l'oxydation (Kebieche, 2009).

#### I.5.4. Test hémolyse

Le test d'hémolyse ou KRL (Kit Radicaux Libres), réalisé sur des érythrocytes humains, permet de refléter de façon globale le potentiel de défense d'un individu vis-à-vis d'une agression aux radicaux libres. Dans ce test on utilise l'acide ascorbique comme standards, les résultats obtenus sont représentés dans les figures 41, 42, 43.

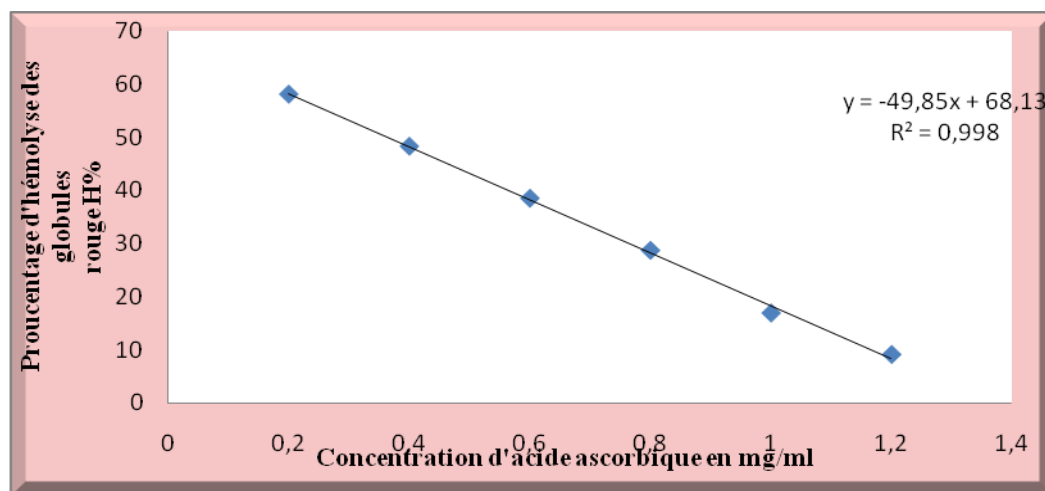


Figure 41 Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique dans le teste hémolyse

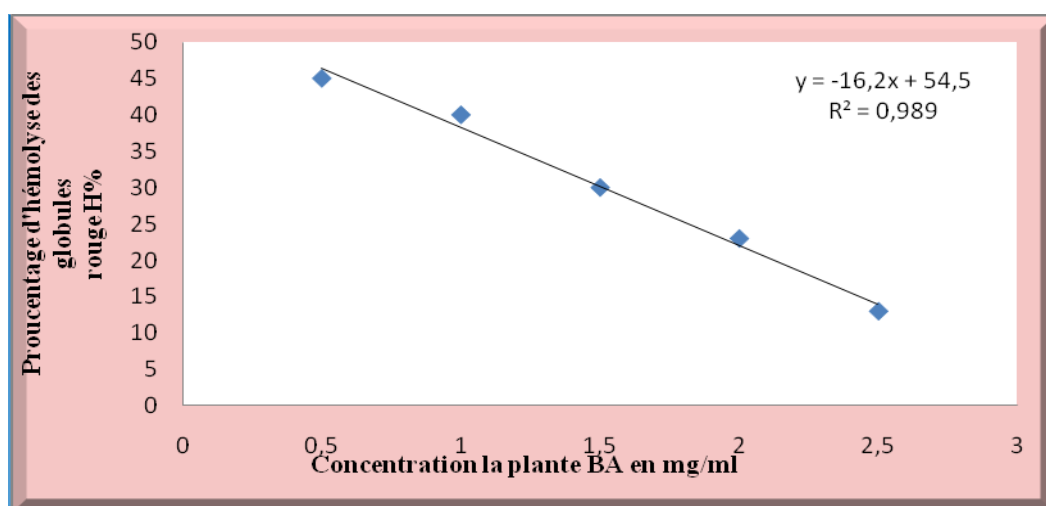


Figure 42 : Courbe des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse globules rouge en termes de concentrations d'extrait AB

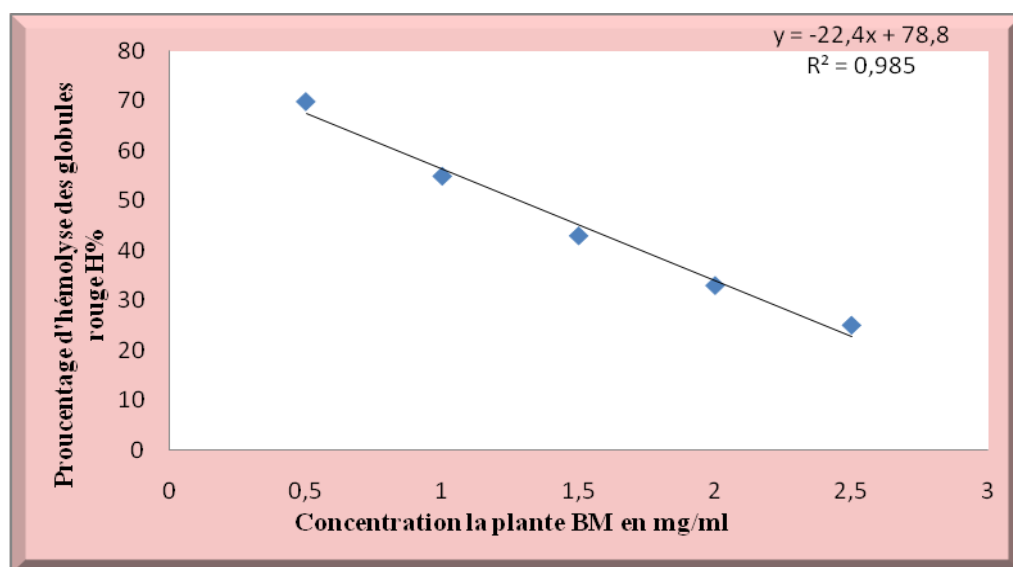
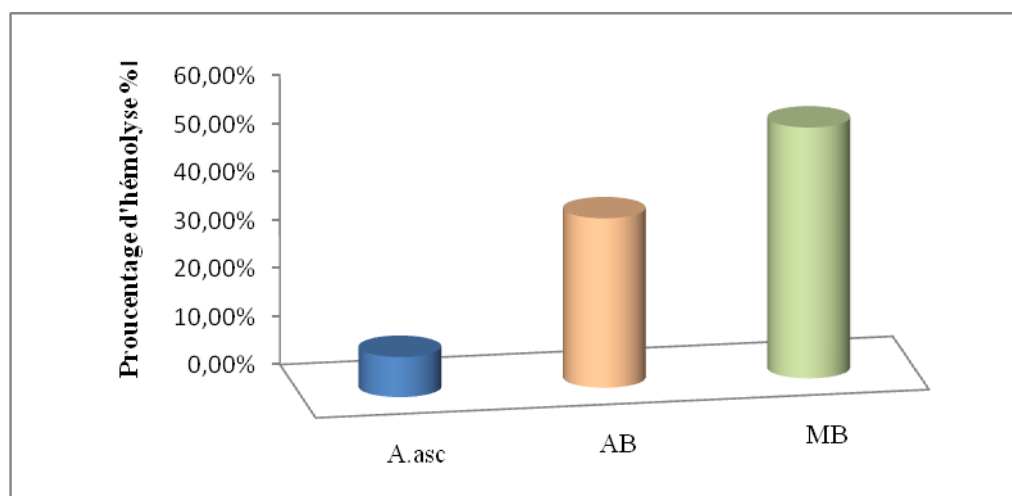


Figure 43 : Courbe des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse globules rouge en termes de concentrations d'extrait MB

Les pourcentages d'inhibition du test hémolyse mesurent pour la concentration 1.2mg/ml présenté dans la figure suivant.



**Figure 44 :** Variation de pourcentage d'inhibition du test hémolyse.

Les résultats illustrés dans la figure(44) montrent que le maximal pourcentage d'inhibition a été enregistré pour l'acide ascorbique (8.306%) mesure a une concentration 1.2 mg/ml. En revanche, les extraits **AB** et **MB** à la même concentration possèdent un pourcentage d'inhibition d'ordre 35.06%, 51.92% respectivement.

Selon **Feri, (1990)**, L'acide ascorbique s'est avéré l'antioxydant primaire dans le plasma, il est classe parmi les antioxydants les plus puissants connus,

On remarque que l'extrait **AB** est plus efficace que **MB** contre l'oxydation des lipides dans la membrane d'érythrocyte.

Cette différence d'activité pourra être due à l'effet de la solubilité des composés dans les milieux réactionnels. Puisque l'acide ascorbique (vitamine C) est classé comme un composé hydrosoluble, il peut agir alors contre la propagation radicalaire.

De nombreuses études ont démontré la capacité des composés phénoliques pour protéger les globules rouges contre les stress oxydatifs (**Valente et al ., 2011**). Il peut être assidu au le site des flavonoïdes dans les membranes cellulaires qui sont les sites de peroxydations lipidiques (**Ferrali et al ., 1997**). Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif.

## II .7 . Evaluation l'activité antifongique

### II .7 .1. Test identification des souches fongiques :

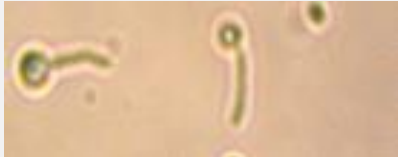
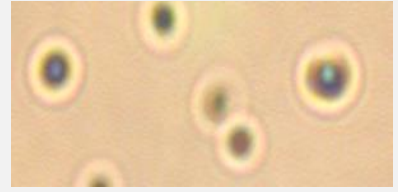

#### II.7 .1. 1. Identification des levures :

Pour validation des types des souches étudiés nous avons fait les tests suivants:  
(CHABASSE, 2002)

- **Test de blastèse pour les candida :**

Les résultats d'observation microscopique obtenus après le test de blastèse sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau14** : Examen microscopique de ; *C. glabrata*, *C. albicans* et *C. tropicalis* après le test de blastèse (**Grossissement x100**).

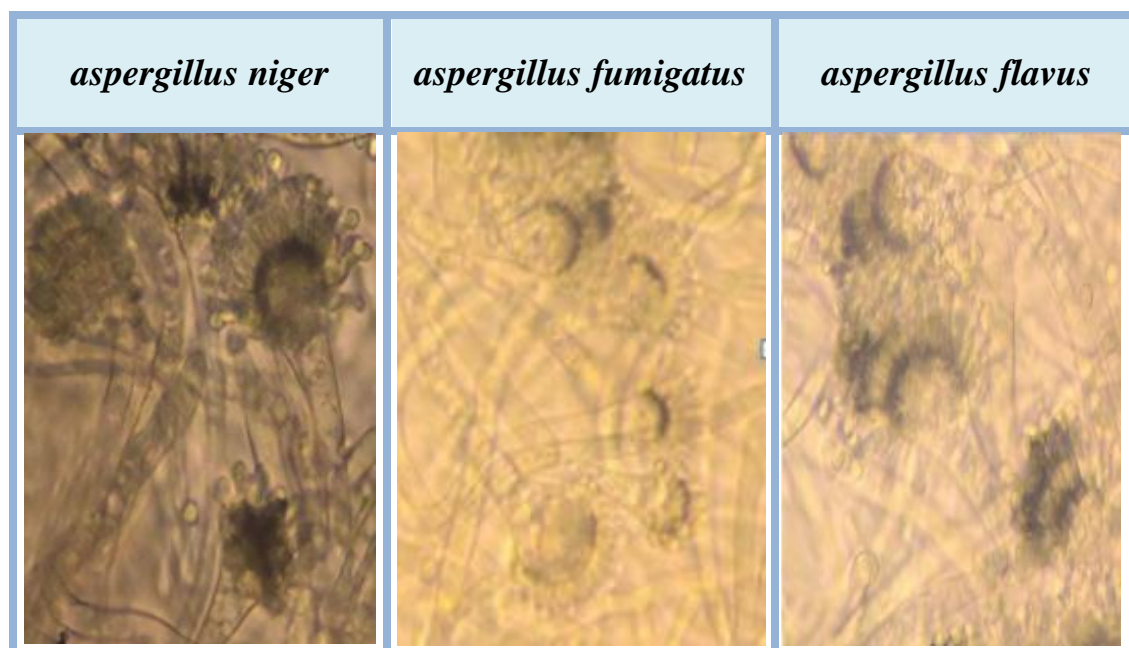
MICRO – ORGANISMES	Production de tubes germinatifs après 3-4h d'incubation à 37°C.		
	T <sub>0</sub>	T+3h	Grossissement x100
<i>Candida albicans</i>	-	+	
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	
<i>Candida glabrata</i>	-	-	

#### II.7 .1. 2 Identification des moisissures :

Les aspergillus sont reconnaissables à l'examen microscopique par les filaments septés portant des têtes aspergillaires (spécifiques du genre *Aspergillus*) (CHABASSE, 2002).

Les résultats d'observation microscopique obtenus sont regroupés dans le tableau(15):

**Tableau 15** : Aspect microscopique des aspergillus au bleu de méthylène, obj x 100 [Photos du service de parasitologie mycologie, laboratoire el-madjed – el-oued.]



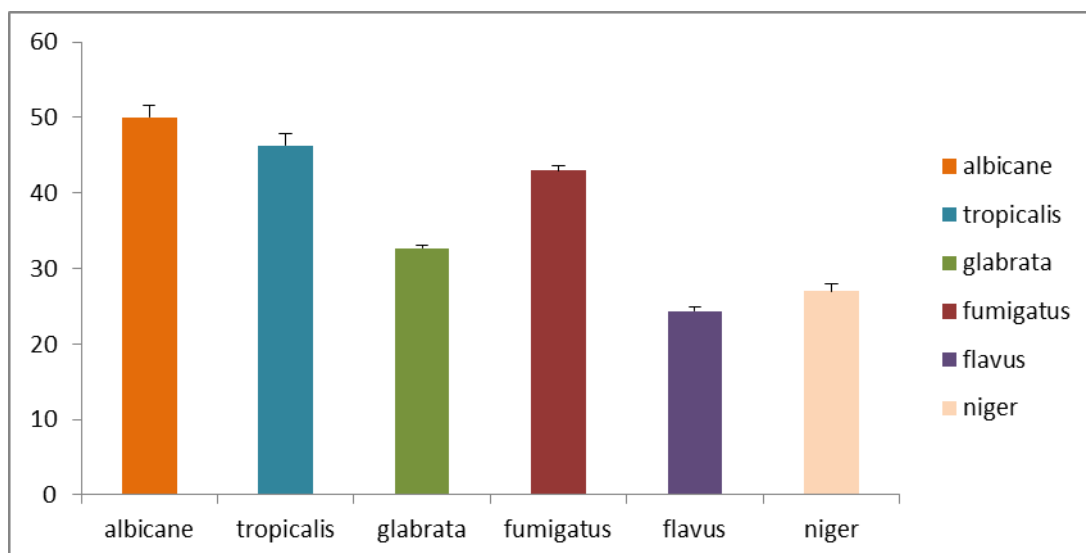
### II.7. 2. Les résultats de l'antifongigramme :

L'antifongigramme permet de mesurer la capacité des extraits de feuilles de deux variétés AB et MB d'espèce *Vitis vinifera* à inhiber la croissance fongique *in vitro* et la comparer avec un antifongique de référence (flucazole)<sup>®</sup>.

Cette étude a été effectuée sur 6 souches fongiques : *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, et *Aspergillus niger*. Selon (carson et al. 1995 et cavallo et al. 2006).

### II.7. 2.1 L'antifongigramme d'antifongique de référence flucazole®

La représentation graphique des diamètres d'inhibition des souches fongiques étudiées vis-à-vis de l'antifongique de référence flucazole® est regroupée dans la figure (45)



**Figure 45 :** Diamètres en mm des zones d'inhibition les souches fongiques par l'antifongiques de référence flucazole®.

D'après les résultats obtenus, toutes les souches fongiques sensibles à la flucazole® avec différents des diamètres des zones d'inhibition Le plus grand a été enregistré sur *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 50 mm, et le plus petit a été enregistré sur *Aspergillus niger* avec des zones d'inhibition de 24.33 mm. En ce qui concerne les souches *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* ont présenté des zones d'inhibition de 46.33 mm, 32.67 mm ,43mm et 27 mm respectivement.

Ceci peut être expliqué par l'effet le fluconazole qu'est un dérivé triazolé aux effets fongistatiques qui permettent l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol dans la cellule du champignon, celui –ci serait responsable des lésions de la membrane cellulaire.

La flucazole® est hautement spécifique des enzymes spécifiques P-450 des cytochromes fongiques (Florence Robert-Gangneux et al., 2010).

### II.7.2.2. L'antifongogramme d'extrait de la plante AB

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de la plante AB vis-à-vis des souches fongiques sont regroupés dans les tableaux (16) :

**Tableau 16** : les diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait de la plante AB vis-à-vis des souches fongiques.

Les souches fongiques	Concentration des extraits de la plante AB testés sur les Souches fongique			
	5	10	20	50
<b>C.albican</b>	8±1	10±0.25	13±0.57	6±0.577
<b>C.tropicalis</b>	6±0.5	7.33±1.20	15.5±0.5	6±0
<b>C.glabrata</b>	8.71±0.45	9±2.46	11±0.6	14±0.577
<b>AS.flavus</b>	6.33±1.85	7.33±1.20	8.71±0.45	6±0
<b>AS.niger</b>	7.5±0.65	10.5±0.5	11±0.38	6±0.5
<b>AS.fumigatus</b>	8±0.4	9±2.92	9±1	6±0.5

\*Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=3).

On observe des diamètres zones d'inhibitions différentes selon la souche testée (Annexe 6).

La souche la plus efficacement inhibée par l'extrait de la plante AB est la levure *Candida albicans* à concentration 10 mg/ml avec une zone de 45 ±2 millimètre autour du disque, tandis que *Candida tropicalis* et *Candida glabrata* on remarque que des diamètres zones d'inhibition de 40±2.92 mm et 30±0.645 mm pour les concentrations 5 mg/ml et 10 mg/ml respectivement, puis ces valeurs des diamètres zones d'inhibition diminué petit à petit jusqu'à une activité nul à 50 mg/ml.

On observe aussi que l'extrait de la plante AB possède une activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* où les meilleurs résultats représentent des zones d'inhibition des diamètres respectivement de  $39 \pm 2.77$  mm,  $20 \pm 1$  mm,  $23 \pm 0.23$  mm pour les concentrations suivantes : 10mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml. Puis toutes ces valeurs des diamètres zones d'inhibition diminué petit à petit jusqu'à une activité nul à 50 mg/ml.

### II.7.2.2.3 L'antifongigramme d'extrait de la plante MB

**Tableau 17 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait MB de la plante vis-à-vis des souches fongiques.

Les souches fongiques	Concentration des extraits de la plante AB testés sur les Souches fongique			
	5	10	20	50
<b>C.albican</b>	8±1	10±0.25	13±0.57	6±0.577
<b>C.tropicalis</b>	6±0.5	7.33±1.20	15.5±0.5	6±0
<b>C.glabrata</b>	8.71±0.45	9±2.46	11±0.6	14±0.577
<b>AS.flavus</b>	6.33±1.85	7.33±1.20	8.71±0.45	6±0
<b>AS.niger</b>	7.5±0.65	10.5±0.5	11±0.38	6±0.5
<b>AS.fumigatus</b>	8±0.4	9±2.92	9±1	6±0.5

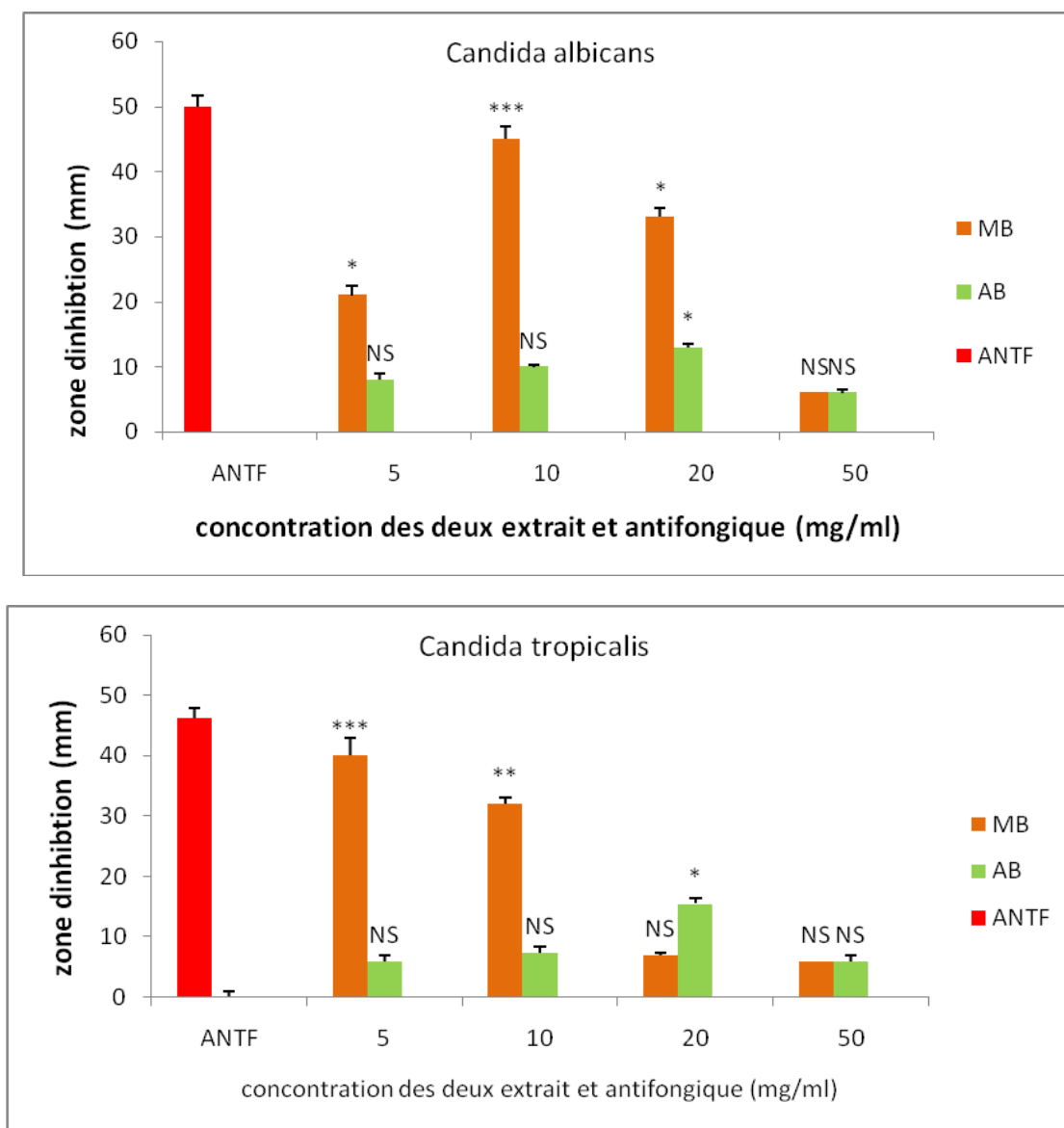
\*Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=3).

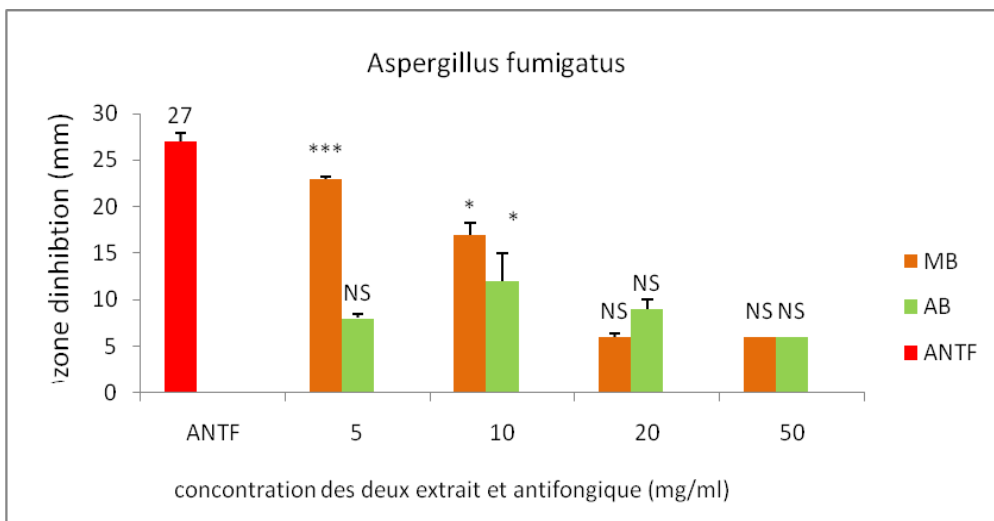
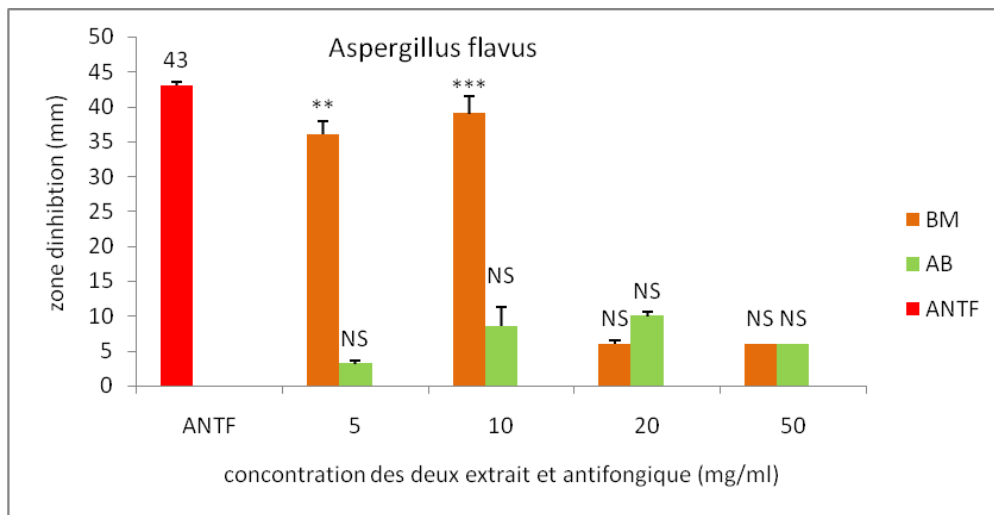
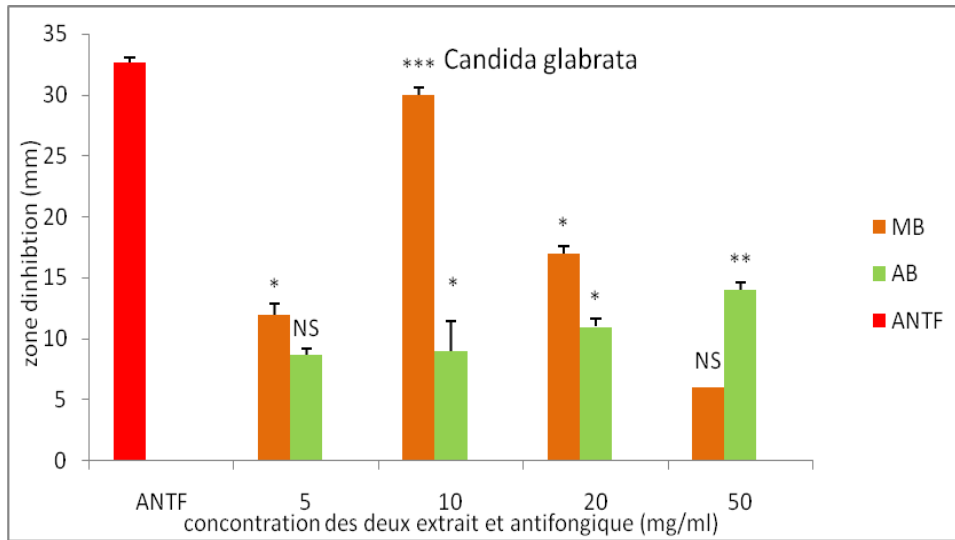
On remarque que la souche la plus efficacement inhibée par l'extrait de la plante MB est la levure *Candida tropicalis* à la concentration 20 mg/ml avec une zone de  $15.5 \pm 0.5$  millimètre autour du disque, tandis que pour *Candida albicans* on remarque que des diamètres zones d'inhibition augmentent jusqu'à  $13 \pm 0.57$  mm avec la concentration 20 mg/ml. Toutes ces valeurs des diamètres zones d'inhibition diminué petit à petit jusqu'à une concentration 50 mg/ml qu'aucune activité n'est signalé. Concernant le *Candida glabrata* on remarque une augmentation des zones d'inhibition avec l'augmentation de concentration ;  $8.71 \pm 0.45$  mm pour une concentration 5mg/ml et  $14 \pm 0.577$  mm pour une concentration de 50 mg/ml.

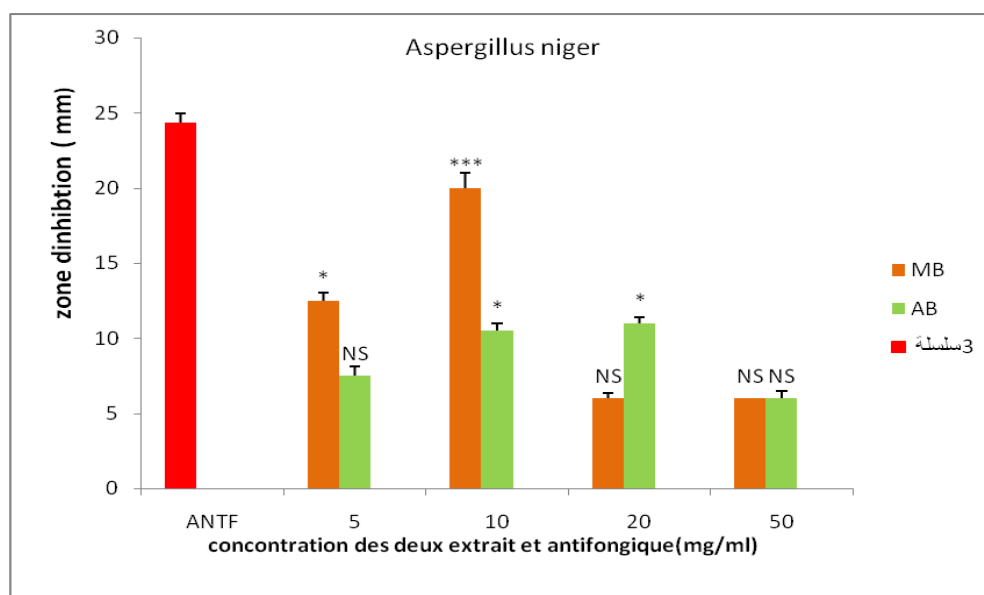
En ce qui concerne les souches *aspergillus flavus*, *aspergillus fumigatus* et *aspergillus niger* on remarque que l'extrait de la plante MB possède une faible inhibition de croissance sur ces moisissures avec le meilleur zone d'inhibition de  $11 \pm 0.38$  mm a été marqué pour *aspergillus niger* avec la concentration 20mg/ml.

**II.7.3.Comparaison entre l'activité de l'antifongique de références et les extraits des plantes AB et MB :**

**Figure 46 :** Comparaison de l'activité de l'antifongique de références et les extraits des plantes AB et BM contre les souches testés :







L'analyse de la variance des moyennes des diamètres de zone d'inhibition d'extrait de la plante AB indique qu'il y a une différence très hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport à celui de l'antifongique de référence ont été marqué par rapport chaque souche testée avec les valeurs de concentration suivante:

Pour *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* : ont été marqué pour la concentration 10 mg/ml. Alors que *Candida tropicalis* et *Aspergillus fumigatus* ont été enregistrée dans la concentration 5 mg/ml.

Concernant L'analyse de la variance des moyennes des diamètres de zone d'inhibition l'extrait de la plante MB a montré une différence hautement significative ( $p < 0.01$ ) en comparaison avec l'effet d'antifongique de référence. Ces résultats ont été obtenus vis-à-vis *Candida glabrata* avec la concentration 50 mg/ml.

## II.7.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

### II.7.4. 1. Détermination (CMI) sur milieu liquide par méthode du macro- dilution:

La CMI est définie comme est la concentration minimale de l'extrait qui inhibe plus de 70 % de la croissance fongique. Les résultats ont été déterminés par la technique de macro-dilution en milieu liquide pour les extraits de feuilles de deux variétés AB et BM d'espèce *vitis vinifera* qui a démontré une activité antifongique sur les différentes souches levuriques testées.

#### II.7.4.1.1. la détermination de CMI d'extrait de feuilles de la plante AB :

Les résultats relatifs à la croissance des levures étudiées soumises à l'action des différentes concentrations d'extrait de feuilles de la plante AB sont illustrés dans le tableau 18 :

**Tableau 18:** L'activité antifongique d'extrait de feuilles de la plante AB sur les espèces de *Candida.sp* testées.

Les souches fongiques	Concentration des extraits de la plante AB testés sur les Souches fongiques						
	1	5	8	10	15	20	50
C. albican	8.89 %	32.2 %	41.05 %	69.72 %	83.92 %	41.05 %	ND
C. tropicalis	31.57 %	78.94 %	57.89 %	47.36 %	31.57 %	2.63 %	ND
C. glabrata	7.14 %	28.57 %	33.31 %	50 %	70.64 %	57.14 %	ND

ND : Non déterminé

À partir les résultats illustrés dans le tableau (18), la plus faible CMI d'extrait de feuilles de la plante AB a été obtenue sur *C.tropicalis* (5 mg/ml) avec le taux d'inhibition de 78.94%, tandis que la plus haute CMI a été marqué sur. *Candida albicans* et *C.glabrata* avec une concentration de 15 mg/ml avec le taux d'inhibition de 83.92 %et 70.64 %.

D'après les résultats mentionnés, on peut classifier l'efficacité d'extrait des feuilles de la plante AB testée contre les *Candida. sp* selon l'ordre décroissant suivant :

*C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata*.

### II.7.4.1.2. Détermination CMI d'extrait de feuilles de la plante MB

Les résultats relatifs à la croissance des levures étudiées soumises à l'action des différentes concentrations d'extrait de feuilles de la plante MB sont illustrés dans le tableau :

**Tableau19:** Activité antifongique d'extrait de feuilles de la plante BM sur les espèces de *Candida.sp* testées :

Les souches fongiques	Concentration des extraits de la plante MB testés sur les Souches fongique.						
	1	5	8	10	15	20	50
<i>C. albicans</i>	ND	7.25 %	10.3 %	14.25 %	18 %	28 %	ND
<i>C. tropicalis</i>	ND	5 %	11.21 %	19.61 %	20 %	31.57 %	ND
<i>C. glabrata</i>	ND	2.14 %	5 %	7.14 %	14.28 %	20.4 %	40.28 %

ND : Non déterminé

D'après les résultats illustrés dans le tableau, on observe que l'efficacité d'extrait de feuilles de la plante MB testées contre les *Candida. sp* remarque un faible pouvoir inhibiteur et tous les valeurs des taux d'inhibition sont inférieur au seuil limite arbitraire de 70 %.

L'extrait de feuilles de la plante MB ont inhibé la pousse fongique de *C. tropicalis* et *C. albicans* avec le taux d'inhibition de 31.57 % et 28% dans la concentration de 20 mg/ml respectivement. Alors que *C. glabrata* 40.28% dans la concentration 20 mg/ml.

D'après les résultats mentionnés on peut être classées l'efficacité d'extrait de feuilles de la plante MB testées contre les *Candida.sp* selon l'ordre décroissant suivant :

*C. glabrata.* >*C. tropicalis* > *C. albicans.*

### II.7.4.2. Détermination (CMI) par méthodes de contact direct en milieu solide.

Selon (**Dramane et al. 2010**), les extraits dont la zone d'inhibition a un diamètre supérieur ou égal à 10 mm, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Par conséquent ce test a été réalisé seulement pour L'extrait de la plante AB.

**Tableau20:** Effet inhibiteur de différentes concentrations d'extrait de la plante AB sur la croissance.

Les souches fongiques	Concentration des extraits de la plante AB testés sur les Souches fongique						
	1	5	8	10	15	20	50
As. niger	5.55%	26.38 %	54.16 %	79 %	33.33%	ND	ND
As. Fumigatus	15.62%	62.5 %	31.25 %	%25	10 %	ND	ND
As. flavus	31.25%	63.75 %	75 %	85 %	12.5 %	ND	ND

ND : Non déterminé.

Les résultats du pourcentage d'inhibition d'extrait de la plante AB déterminés à partir des diamètres des zones d'inhibition (**Tableau20**), montrent qu'il exerce une activité inhibitrice sur toutes les souches fongiques testées avec un pourcentage d'inhibition variant.

D'après le tableau (**31**), on remarque que le meilleur pourcentage d'inhibition pour *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* est observée à la concentration 10 mg/ml. Alors que, le meilleur pourcentage d'inhibition pour *Aspergillus flavus* était à la concentration de 5 mg/ml avec une valeur de 62.5%. D'après les résultats mentionnés on peut être classées l'efficacité d'extrait de feuilles de la plante AB testées contre les *Candida.sp* selon l'ordre décroissant suivant : *As. Flavus* > *As. Niger* > *As.fumigatus*.

## II. Discussion

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antifongiques. De nombreux travaux soulignent cet effet antimicrobien des principes actifs naturels (**Mubashir et al., 2009**).

La variabilité dans l'activité antifongique de deux plantes peut être due à la différence dans la teneur en polyphénols de leurs extraits méthanoliques comme montrés par plusieurs auteurs. En effet, la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique des feuilles de plante AB était de l'ordre de  $(280.86 \pm 1.25 \text{ mg EAG/g MS})$ , alors que dans celui de feuilles de plante MB, elle correspondait à  $(183.05 \pm 1.66 \text{ mg EAG/g MS})$ .

En effet, **Naçira Amara et al., (2016)** signalent que l'extrait des feuilles de l'espèce *Vitis vinifera* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches de *Bacillus subtilis*, *pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et une activité de moindre degré sur *Candida albicans*.

Selon les résultats enregistrés, la capacité antifongique des extraits de feuilles de deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera* sont plus différentes. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différente entre les deux extraits (**Irkin et al., 2004**). Ces résultats peuvent également être expliqués par le taux élevé en composés phénoliques dans l'extrait des feuilles de la plante **AB** que l'extrait des feuilles de la plante **MB**.

Une étude réalisée par **Didem et al., (2008)** sur l'activité antifongique des feuilles de *Vitis vinifera* indique que l'extrait des feuilles possède une grande efficacité sur *Candida albicans* et *parapsilosis*.

**Cowan (1999)** a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance microbienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (**Dhaouadi et al., 2010**).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour, 2000**).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des composés phénoliques est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind, 1995**).

En analysant les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les micro-organismes qui ont montré de grandes zones d'inhibition observées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ne sont pas toujours qui présentent les plus faibles valeurs des CMI. En fait, le

diamètre de la zone d'inhibition peut être affecté par la volatilité de l'extrait. De la même manière, plusieurs auteurs ont signalé que les souches qui présentaient de grandes zones d'inhibition (méthode de diffusion) ne sont pas toujours les plus sensibles (les valeurs de CMI ont été plus faibles) car la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas l'efficacité antimicrobienne du produit testé. Elle peut être affectée par la solubilité et l'évaporation de l'extrait (**Cimanga et al., 2002 ; Hernandez et al., 2005**).

Selon les résultats on montre que les genres *Candida sp* sont plus sensibles que les moisissures. Cela peut s'expliquer par l'accessibilité directe de la paroi des levures et ce n'est pas le cas pour les moisissures protégées par la structure mycélienne rigide, en effet, certains auteurs ont mentionnés que leur paroi est constituée de trois polysaccharides :  $\beta$ - 1,3 glucane, la chitine et la mannane associées par des liaisons chimiques (**Farkas et al ., 1985**). Il est probable que les molécules contenues dans les extraits inhibent la synthèse de la chitine et agissent alors comme certains antibiotiques (**Isono et Suzuki, 1979**). D'autre part, le mécanisme d'action des agents antimicrobiens sur les levures reste mal connu (**Isono et Suzuki, 1979 et Hassan et al., 2006**).

On remarque à partir les résultats de notre étude que d'extraits de feuilles des deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *Vitis vinifera* possède une forte capacité inhibitrice contre les souches testées dans les faibles doses où l'effet atteint son apogée à partir la concentration 5 mg/ml à 15 mg/ml. D'autre part dans les fortes doses n'est aucune activité inhibitrice sur les souches fongiques pour des raisons reste inconnu, ces résultats ouvrent la voie à d'autres études pour déterminer les causes responsables de ces effets.

# CONCLUSION

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antioxydante et antifongique des feuilles des deux variétés **AB** et **MB** d'espèce *vitis vinifera*.

Le criblage préliminaire par des tests colorimétriques a révélé la présence des composés réducteurs et des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des triterpènes en quantités importantes. Nous observons aussi l'absence des alcaloïdes et des saponines dans nos extraits.

L'analyse quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes, des flavanols totaux et des tanins condensés a été réalisée par les courbes d'étalonnage des étalons d'acide gallique, rutine, quercétine et catéchine respectivement. Celle-ci nous a permis de confirmer que notre plante contient des quantités importantes en composés phénoliques. Ces quantités varient selon la variété.

La teneur en polyphénols totaux pour les différents extraits a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, on a remarqué que l'extrait des feuilles des deux variétés de *vitis vinifera* étudiées **AB** et **MB** sont de l'ordre ( $280.86 \pm 1.25$  et  $183.05 \pm 1.66$  mg EAG/g MS) respectivement.

Pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait alcoolique en utilisant des tests: la capacité antioxydante totale (CAT) par la réduction de molybdène, l'extrait des feuilles de la variété **AB** possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de ( $428.23 \pm 10.13$  mg EAG/g Ms) que l'extrait des feuilles de la variété **MB** qui révèlent une capacité antioxydante totale de l'ordre de ( $227.88 \pm 8.13$  mg EAG/g Ms).

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH. Et en comparant les  $IC_{50}$  des deux extraits testés par rapport à celle de l'acide ascorbique. Les résultats montrent que l'acide ascorbique a une activité antiradicalaire très puissante avec  $IC_{50}$  d'ordre 0,0142mg/ml. Par ailleurs, les extraits **AB** et **MB** ont montré les activités antiradicalaires les plus faibles que l'étalon en affichant les  $IC_{50}$  les plus fortes de l'ordre de 0.0373 et 0.05 mg/ml respectivement.

L'étude a également montré que divers extraits de *Vitis vinifera* contiennent une quantité large et variée de composés phénoliques est très efficace dans la protection de la membrane des globules rouges contre l'agression induite par  $H_2O_2$  et  $FeCl_3$  particulièrement l'extrait

de la variété **AB** alors que le pourcentage d'inhibition qui a été estimée à (35.06%), cette valeur très élevée par rapport à l'acide ascorbique (8.306%), et le test de FRAP montre que les extraits de *Vitis vinifera* possèdent une forte capacité d'inhiber l'initiation des réactions radicalaires par les ions métalliques.

L'activité antifongique a été déterminée sur six souches fongiques (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*) selon la méthode de diffusion des disques, les résultats de notre étude montrent que l'extrait de feuilles de la **AB** possède une forte capacité inhibitrice contre les souches testées, On a trouvé aussi que le champignon le plus sensible est *Candida albicans* avec une zone de  $45 \pm 2$  mm. Par ailleurs l'extrait de la plante **MB** possède une faible activité inhibitrice contre les souches testées.

En ce qui concerne la détermination des concentrations minimales inhibitrices, les souches fongiques ont été inhibées sous l'action d'extrait des feuilles de la plante **AB** avec des concentrations variant de 5 à 15 mg/ml. Alors que l'extrait des feuilles de la plante **MB** avec des concentrations variant de 20 à 50 mg/ml.

En termes de limites, il convient de placer ce travail dans un contexte plus prospectif, car sur de nombreux points, il ouvre plusieurs nouvelles voies de recherche.

# **Référence bibliographiques**

## **A**

**Abderrazak M. et Joël R. (2007).** *Abderrazak M. et Joël R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.*

**Abdurrahman, A., Gokhan, Z., Gokalp, O. G., Yavuz, S. C., Ahmet, D.(2013).** *Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic Centaurea L. species. Food and Chemical Toxicology, 55:290-296.*

**AFSSA; evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animale; 2006, rapport synthétique; bcastegnaro, M pfohl-leszkowicz, A. les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine dans la sécurité alimentaire du consommateur, edlavoisier, techniques de documentation, 2002**

**Abiramia, Nagarani G Et Siddhuraju P., (2014).** *In Vitro Antioxidant, Anti-Diabetic, Cholinesterase And Tyrosinase Inhibitory potential Of Fresh Juice From Citrus Hystrix And C. Maxima Fruits ; Food Science And Human Wellness 3 : 16–25.*

**Ahrizat, N. E. et Sobti , A.(2016).** *Effets de quelques plantes médicinales du Sahara central Algérien sur quelques activités biologiques, status redox et le diabète chez rats Wistar rendus diabétique par injection d'alloxane. Mémoire de master académique en sciences biologiques. Université Echahidhammalakhdar ,El oued.*

**Avissar et al., 1989A vissar N., Whitin J.C., et Allen PZ. (1989).** *Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase Journal of Biological Chemistry. 2: 15850-15855*

**Ayad, R. (2008).** *Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structural des métabolites secondaires del'espèce zygothallium cornutum. Mémoire de magister en chimie organique, Université Mentounri Costantine.*

## Référence Bibliographiques

---

### B

**Barros ,L., Ferreira, MJ., Queiros ,B., Ferreira, I. C. F. R et Baptista, P** .(2007).Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities.*Food Chemistry*, 103, 413-419.

**Benbrinis , S.**(2012).Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolinachamaecyparissus*. Mémoire de magister en biochimie .Université Ferhat Abbas,Setif

**Badiaga, M., (2011).** Etude Ethnobotanique, Phytochimique Et Activités Biologiques De *Nauclea Latifolia Smith* Une Plante Médicinale Africaine Récoltée Au Mali, Thèse De Doctorat, Université De Bamako.10 P.

**BERGOGNE-BEREZIN et DELLAMONICA, 1995)** BERGOGNE-BEREZIN E. et DELLAMONICA P., 1995-Antibiothérapie en pratique clinique. Ed. Masson Paris. 486p

**Benedict, S. and Colagreco, J.,** Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS. *Cancer Nurs*1994.17: 411-417.

**Belyagoubi Née Benhammou, N.**(2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat.Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C.** (1995).Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.*Lebensmittel- Wissenschaft und –Technologie*, 28:25–30.

**Bidie, A. P., N'guessan, B. B., Yapo, A. F., N'guessan, J. D. Et Djaman, A. J.,**(2011). Article Original Activités Antioxydantes De Dix Plantes Médicinales De LaPharmacopée Ivoirienne.*Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: 1 – 11.

**Bruneton, J.** (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation.* Paris: Lavoisier.

**Bruneton, J.** (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie-Plantes médicinales (3è éd).* Paris Techniques et documentations

**BouBehri 2014 C. Bou Behri.,** « étude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimique », 2014, Univ. Biskra

## Référence Bibliographiques

---

**Bouhadjra. K, 2011** Bouhadjra. K, 2011 . Bouhadjra K., « étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge », 2011, thèse de Magister, Univ. Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou

**Bouras F et A. Houchi., 2013** Bouras F et A. Houchi., 2013. Bouras F et A. Houchi., « Etude de l'activité antioxydante de la plantes rumex vesicarius L », 2013, mémoire Master, Univ. Kasdi, Marbeh, Ouaragla

### C

**Castilla P, Dávalos A, et al. Am J ClinNutr.**2008.Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. Apr;87(4):1053-61.

**Castilla P, Echarri R, et al. Am J ClinNutr** .2006.Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. Jul;84(1):252-62.

**CHABASSE D.** Classification des champignons d'intérêt médical. Elsevier Masson SAS ; Maladies infectieuses 2008 ; [8-088-B-10].

**CHABASSE D. GUIGUEN C., CONTET AUDONNEAU N.** Abrégé de la Mycologie médicale, Edition Masson 1999 ; 1-59,71-4.

**Chouikh, A .,Mekki, M .,et Adjal , E.H.( 2015).** Effects of extraction methods onantibacterial activity of different extracts of calligonum comosum l'her.growing in saharaAlgerian. international journal of recent scientific research ,6, 4, 3534-3536.

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

**Comini L. R., N ez Montoya S. C., Éez P. L., Arg\_\_ello G. A., Albesa I. and Cabrera J. L.** Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from Heterophyllaeapustulata(Rubiaceae). J. Photochem. Photobiol. B: Biology 2011; 102: 108-114.

**Cvallo j. d., chardon h., chidiac., choutet p., courvalin p., dabernat h., drugeon h., dubreuil l., goldstein f., jarvalier v., nicolas-chanoine., pnlipon a., quentin c., rouveix b.,**

## Référence Bibliographiques

---

*sirot j., et SOUSSY C.J., (2006). Communiqué de la comité française de l'antibiogramme. Société Française de Microbiologie. Ed : de janvier.*

*CARSON C.F., HAMMER K.A. et RILEY T.V., (1995). Broth microdilution method for determining the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Microbios, 82: 181*

*CHAMI F., (2005). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of saccharomyces cerevisiae. Phytother.Res.19 (5), 405-8.*

*Chabasse D Tronchin G., Bouchara J.P., Larcher G., and Lissitzky J., "Interactions between Aspergillus fumigatus and basement membrane laminin: Binding substrate degradation", Biol. Cell, 77, (2002), pp. 201-208.*

*Mycologie médicale écrit par Christian RIPERT, éditeur LAVOISIER / TEC ET DOC , livre neuf année 2013, isbn 9782743014889.*

*Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J., 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology, 79, 213–220.*

*Coffman, S. and Hollis, R. J., Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 2000. 44: 747-751.*

## D

*Djahra, A.B. (2015). Cours phytochimie II 2eme Année master. Université Echahid Hamma Lakhdar El-oued. 33p.*

*Delattre et al., 2005. Delattre , J., Beaudeau, J.L., Bonnefont ,R.( 2005). Radicaux Libres Et Stress Oxydant: Aspects Biologiques Et Pathologiques. Lavoisier Edition Tec And Doc Editions Medicales Internationales Paris ,1 – 405.*

*Deliorman Orhan, D., Orhan, H., Ozcelik, B., Ergun, F. 2009. Biological activities of Vitis vinifera L. leaves. Turk, J, Biol 33 pp. 341-348*

## Référence Bibliographiques

---

**Durre, S., Muhammad, A. R.** (2012). *Antioxidant potential of phenolic extracts of Mimusopselengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 547-550.

**Djahra, A. B.** (2013). *Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubiumvulgare L. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar de Annaba, p 54.*

**David ROSSIGNOL**, *Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives : mise en place et évaluation d'une méthode de PCR en temps réel au CHU de Grenoble. 2013 THESE DOCTORAT EN PHARMACIE.*

**Dhaouadi K., Raboudi F., Estevan C., Barrajo\_\_n E., Vilanova E., Hamdaoui M. and Fattouch S.** *Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. J. Agric. Food Chem. 2010; 59: 402-406.*

**Didem DELİORMAN ORHANI, Nilufer ORHANI, Berrin OZCELIK2, FatmaERGUNI** .2008 . *Biological activities of Vitis viniferaL. leaves .Turk J Biol.33 (2009) 341-348.*

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna A., Stocker C., Vidal N.,(2005).** *Antioxidant Activity Of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds. Food Chem. Vol. (97): 654–660.*

**Dermatology 53, 931-954. Hay, R. J., 2006. Fungal infections. Clinics in Dermatology 24, 201-212**

## E

**Edenharder R., Grünhage D., (2003).** *Free Radical Scavenging Abilities Of Flavonoids As Mechanism Of Protection Against Mutagenicity Induced By Tert-Butyl Hydroperoxide Or Cumenehydroperoxide In Salmonella Typhimuriumta102. Mutat. Res, 540: 1–18 Ed Masson. Paris.Pp: 102-103-104-107.*

**Essawi T. and Srouf M.** *Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity.J. Ethnopharmacol. 2000; 70: 343-349.*

## Référence Bibliographiques

---

**El-Waziry, A.M.** (2007). *Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique*. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.

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

**Elevés (Hay, 2006 ; Lupi et al., 2005).** Lupi, O., Tyring, S. K., McGinnis, M. R., 2005. *Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. Journal of the American Academy of*

### F

**Favier, 2003. Favier, A., (2003).** *Le Stress Oxydant Intérêt Conceptuel Et Expérimental Dans La Compréhension Des Mécanismes Des Maladies Et Potentiel Thérapeutique. L'actualité Chimique*, 106-11

**Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D. et Comporti, M.** (1997). *Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity*. *FEBS Lett*, 416, 123-129

**Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourouï, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.** (2008). *Phenolic composition of Cynaracardunculus L. organs, and their biological activities*. *C. R. Biol*, 331 (5) : 372-379.

**Farkas V.** (1985). *Ultra structural cytology of pathogenic fungi*. In: Howard .D.H.(Ed). *Fungal protoplasts .application in Biochemistry and genetics*. 3-30. Marcel Dekker New York..

**Florence Robert-Gangneux, Sylviane Chevrier, Claude Guiguen.** 010. *Les antifongiques disponibles pour le traitement des mycoses systémiques et cutanées profondes*. 320p.

**Fandohan P., Gbenou J. and Gnonlofin B.** 2004- *Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn*. *J. Agric. Food Chem.*; 52: pp.6824-6829.

**Waterhouse, A.** (1999). *Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine*. *Food Anal. Chem.*, 299, pp152-78.

## Référence Bibliographiques

---

### G

**Guinebert et al., 2005.** Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 2005; 554-558.

**Georgopapadakou et Walsh, 1996.** Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J., 1996. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 279-291

**Ghedira K., Goetz, P. & Le Jeune R. (2012).** *Vitis vinifera var. tinctoria L.: vigne rouge Ampelidaceae (Vitaceae). Phytothérapie, 1-6.*

**Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. (2003).** Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70: 561-563.

**Galet P., 1998:** *Précis de viticulture. 7eme Edit. DEHAN, 561 p*

**Galet P., 1993 :** *Précis de viticulture. 6eme Edit. DEHAN, 582 p.*

**Galet P., 2000 :** *Précis de viticulture. 7eme Edit. DEHAN, 602 p.*

**Galet P., 2001 :** *Dictionnaire encyclopédique des cépages. Edit. Hachette, 18-40 p*

**GNANOU DAHODA .2001;** *Contribution à l'étude de l'activité antifongique de BarassusaethiopumMart. (Arecaceae), Doctoraten PHARMACIE.*

### H

**Havsteen, B.H. (2002).** *The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therap.* 96, 67-202.

**Harborne , J.B., (1973).** *Phytochemical Methods, London. Chapman And Hall, Ltd. Pp. 49-188*

**Huglin. P., 1986 -** *Biologie et écologie de la vigne. Edit. Payot Lausanne. Paris, 371 p.*

**Huglin P. et Schneider C., 1998 -** *Biologie et écologie de la Vigne. Edit. Tec & doc, Paris, 370 p*

## Référence Bibliographiques

---

**Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M.** (2007). *The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts*, *Food Chem.* 105: 1126-1134.

**Hernandez T., Canales M., Avila J.G., García A.M., Martínez A., Caballero J., Romo de Vivar A., Lira R.**, 2005. *Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 551-554.

**Hassan S.W., Umar R.A., Lawal M., Biblis L.S., Muhammed B.Y., Dabai Y.U** (2006). *Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of root extracts of *Boxia angustifolia**. *African Journal of Biotechnology*, 5. (18): 1602-07. **Heller R., Esmault R., Lance C.** (1998). *Physiologie Végétale. 6ème édition. Dunod, Paris*.

**Halima IBNELHAJ** *Mycoses opportunistes et immunodépression 2010*

**Huglin P. et Schneider C., 1998** : *Biologie et écologie de la vigne*. Edit. Lavoisier et Tec. et Doc., 43-81 p

**Hidalgo L., 2008** : *Taille de la vigne*. Edit. Dunod, 256 p.

**Henriet JP.** 2011. *Exemplary study for a phlebotropic substance, the EIVE Study [translated from French]*. Fairfield, Conn: Primary Source; not dated. Étude mentionnée et résumée dans : *Natural Standard (Ed). Foods, Herbs & Supplements - Grape seed (Vitis vinifera, Vitis coignetiae)*, *Nature Medicine Quality Standard*

## J

**Javanovic, S.V., Steenken, S., Tomic, M., Marjanovic, B &, Simic, M.J.** (1994). *Flavonoids as antioxidants*. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 4846-4851.

**Jacques Macheix, J., Fleuriet, A., et Allemand, C.J.** (2005). *Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économique)*. Ed, *Presses polytechniques et universitaires romandes: Italie*.

## Référence Bibliographiques

---

### I

**Isono.,Kand., Suzuki. S. (1979).***The polyxins, pyrimidine nucleoside, peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis.Heterocycles 13:333-51.*

### K

**King A., & Young G. (1999).** *characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.*

*Jof the American dietetic association, 99, 213-218.*

**Khanbabae K. et Ree T R. (2001).** *Tannins:Classification and Defenition. Journal of RoyalSociety of Chemistry. 18: 641-649*

**(Koechlin-Ramonatxo, 2006). Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** *Oxygène, stress oxydant et supplémentation antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans la maladie respiratoire. Nutrition Clinique & Métabolisme, 20, 165 – 177.*

**Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007).** *Salinityeffects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakilemaritima. Plant. PhysiolBioch, 45: 244-249.*

**Kiesewetter H, Koscielny J, et al. 2000.***Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitisviniferae) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial.Arzneimittelforschung Feb;50(2):109-17.*

### L

**Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** *Botanique (3é èd). Technique et documentation. Lavoisier . Paris. 211p. Université de Mouloud Mameri Tizi Ouzou.*

**Lugasi A., Hovari J., Sagik., And Biro L., (2003).** *The Role Of Antioxidant Phytonutrients In The Prevention Of Diseases.J.Acta.Biologica. Szegediensis. 47 (14):119-125.(Cited In Mohammedi Z, (2005).*

## Référence Bibliographiques

---

**Lacolley et al., 2007** Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F & Samuel., J.L.,(2007). *Biologie Et Pathologie Du Coeur Et Des Vaisseaux*. Ed, John Libbey Eurotext

**Levinson, 2006a, b** Levinson, W., 2006a. *Cutaneous & subcutaneous mycoses. Review of medical microbiology and immunology*, 659. Levinson, W., 2006b. *Sistemic mycoses. Review of medical microbiology and immunology*,659

**Lagnika, L.** (2005), *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg, p 249.

### M

**Mathew et Nath .2009** Mathew, B. P., Nath, M., 2009. *Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses*. *ChemMedChem* 4, 310-32

**Morena et al., 2002.** Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J. P., & Canoud, B. (2002). *Stress oxydant,hémo- incompatibilité et complication de la dialyse au long cours*. *Néphrologie*, 23 (5), 201 – 208. Poirier, J. 2004 Poirier, J. (2004). *L'indispensable pour vivre en santé*, Edition Merlin, p 72.

**Médart, J. 2009** Médart, J. (2009). *Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative*. Editions De Boeck Supérieur, p 49.

**Mercan, 2010.** Mercan, D. (2010). *Le Stress Oxydatif*. Unilabs. 53p

**Menvielle-Bourg, 2005** Menvielle-Bourg, F. J. (2005). *La superoxyde dismutase , puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale*. *Phytothérapie*, 118 – 121

**Marfak, 2003.** Marfak A. (2003). *Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools*. pp: 6-7-10.

**.Merghem,4 R. (2009).** *Eléments de biochimie végétale (16)*. Ed, Bahaeddine. Algérie

**Mohammedi ,Z.(2013).***Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'algérie*. Thèse de doctorat en biologie, Université aboubekrbelkaid ,Tlemcen.

## Référence Bibliographiques

---

**MAJOB F., KAMALINEJAB M., GHADERI N. et VAHIDIPOUR H.R.,** 2003 *Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of pharmaceutical Research.* 2(2) : 77-82.

**Mbaebie, B. O., Edeoga, H. O., Afolayan, A. J.**(2012). *Phytochemical analysis and antioxidant activities of aqueous stem bark extract of Schotialatifolia Jacq.* *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 118-124.

**Molyneux, P.** (2004). *The use of the stable free radical diphenyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.* *Journal of science technology.* 26(2):211-219.

**McCormick A, Loeffler J, Ebel F.** *Aspergillus fumigatus: contours of an opportunistic human pathogen. Cell Microbiol.* 2010 Novembre: p. 1535-1543.

**McCormick A, Loeffler J, Ebel F.** *Aspergillus fumigatus: contours of an opportunistic human pathogen. Cell Microbiol.* 2010 Novembre: p. 1535 1543.

**MOULINIER C.** *Mycologie médicale, Parasitologie et mycologie médicales : Elément de morphologie et de biologie* 2003 ; ISBN : 2-7430-0488-6.

**.Maamir, S.**(2008). *Etude de pistacia atlantique de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols essais antileishmaniens.* *Mémoire de magister en Biologie* , Université M'hamed Bougarz, Boumerdes.

**Mubashir H.M., Iqbal Zargar M., Bahar Ahmed A., Saroor A.K., Shamshir K., Singh P.,** 2009. *Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of Marrubium vulgare L.* *Journal of Research and Development.* 9: 53-56.

**Mohammedi Zohra,**(2013). *Etude Phytochimique Et Activités Biologiques De Quelques Plantes Médicinales De La Région Nord Et Sud Ouest De L'algérie* *The Thèse De Doctorat En Biologie Univ. De Tlemcen Faculté Des Sciences département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire* 160p.

## N

**Nait Achour, K.** (2012). *Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'eucalyptus poussant dans la région de Tizi ouzou.* *Mémoire de magister en biologie*,

**National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS),** *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, june 1999. Approved Standard; NCCLS document M31-A, 1999.*

## Référence Bibliographiques

---

### O

**Odds et al., 2003** Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., 2003. *Antifungal agents: Mechanisms of action. Trends in Microbiology 11, 272-279*

**O.I.V.2010.** *Statiques de viticulture mondiale..*

**Villa P., 2005 :** *La culture de la vigne. Edit. Devecchi, 20 p.*

### P

**Paris M Et Hurabielle. (1981).** *Abrégé De Matière Médicale. Pharmacognosie.Tome . Springer Berlin Heidelberg*

**Pincemail et al., 1999** Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraign, J. O. (1999). *L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaissaux, Cœur, Poumons, 4, 1 – 7.,*

**Prabhu et al., 1992.** Prabhu A V ., Khelfane k .& Bekal S . (1992). *Compilation des maladies fongiques des plantes en Algérie . Ed office des publication Universitaire (OPU), Algérie . 85 p .*

**Petit A-N., 2008 -** *Effets de fongicides anti-botrytis sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne. Thèse Doctorat, Univ., Reims, 129 p.*

**Park YK, Kim JS, Kang MH.2004.** *Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: double-blind, placebo controlled intervention trial. Biofactors.,22(1-4):145-7*

**Popovici, C., Saykova, I. & Tylkowski, B. (2009).** *Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie Industriel 4: 25-39.*

**Pfaller, M. A. and Diekema, D. J.,** *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. ClinMicrobiol Rev 2007.20: 133-163.*

## Référence Bibliographiques

---

**Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Jungkind DL.** *Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania].* Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], 1995, p. 248.

### R

**.Raven, H., Evert, R.F., et Eichhorn S.E. (2000).** *Biologie végétale (6<sup>e</sup> èd).* (B. Jules., et M. Charles, Trad.). Paris.

**Reynier A., 2007-** *Manuel de viticulture. Edit, Tec. doc, Paris, 532 p*

**Rakici O, Kiziltepe U, et al. 2005.** *Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. Int J Cardiol.* Nov 2;105(2):209-15.

**Roginsky, V., &Lissi, E. A. (2005).** *Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food chemistry.*92:235-254.

**Rivero-Pérez, M. D., Muniz, P., González-Sanjosé, M. L. (2008).** *Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. Food and Chemical Toxicology,* 46: 2815–2822.

**Reynier A., 1986-** *Manuel de viticulture. Edit, bailliére 1, Paris, 406 p.*

**Reynier A., 1991-** *Manuel de viticulture. 6<sup>eme</sup> Edit, bailliére 1, Paris, 365 p.*

**Reynier A., 2007 :** *Manuel de viticulture. Edit. Lavoisier, Tec. et Doc., 529 p.*

**Rowley A. et Ribaut J., 2003 -** *Le vin. Une histoire de goût. Edit. Gallimard, 160 p.*

**Ribereau-Gayon, P. (1972).** *Propriétés chimiques des phénols. In "les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, p : 29-57.*

### S

**Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F.K. (2006).** *Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry,* 67, 2058-2070.

## Référence Bibliographiques

---

**Sun, T., Powers, J.R., Tang, J.** (2007). Evaluation of the antioxidant activity of asparagusbroccoli and their juices. *Food Chem*, 105: 101-106.

**Seidel, V.** (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. *Natural products isolation. Humana Press (Totowa)*, 27-37.

**Shenoy SF, Keen CL, et al.** *Thromb.* 2007. Res Effects of grape seed extract consumption on platelet function in postmenopausal women.; 121(3):431-2.

**Scalbert, A.** (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance. Plenum Press, New York*.

**Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I.** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, pp 4267-4274.

**Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N.** (2001). Analyses of condensed tannins. *Anim. FeedSci. Technol.*, 91, pp 21-40.

**Sanchez-Moreno, C.** (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. **8**: 121-137.

**Selma, D., Imed, H., Saloua, F., Yassine, M., Hervé, C., Belgacem, H., Karim, H.** (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of functional foods*, 4:423-432.

## T

**Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., And Mathé G.,** (2002). Polyphenol Do They Play A Role In The Prevention, Of The Human Pathologies , *Biomed .Pharmacother.* 56:200-207. (Cited In Djemaizoueglache S, 2008).

**Talbi, M.,** (2015). Dosage des polyphénols de la plante *D'artemisia Campestris*. *Lparchromatographie HPLC. Mise en évidence de l'activité biologique. Mémoire de magesterenchimies, Université Ahmed Benbella ,D'oran*.

**Thomas, M., Emilie, D., Gaëtan, L. F., Marie, E. L., Claire, E.** (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry* **131**:754-760.

## Référence Bibliographiques

---

*This ,p.,Lacombe,T; wine grape ( vitisvinifera) color associates with allelic variation in the domestication gene Vvmyb A1 .Theor .Appl.Genet.114,p723-730.*

### U

*ULANOWSKA et al., 2007.ULANOWSKA K., MAJCHRZYK A.,MOSKOT M., JAKÓBKIEWICZ-BANECKA J. et WĘGRZYN G., 2007-Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. Biologia 62:132-135*

### V

*Vislocky LM, Fernandez ML. 2010.Biomedical effects of grape products.Nutr Rev. Nov;68(11):656-70.*

*Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Ed, Springer: U.S.A.*

### W

*Wolff, J P. (1968). Méthodes générales d'analyse ; dosage des produits d'oxydation. Ed ;Azoulay ; Paris : 259-266*

### Y



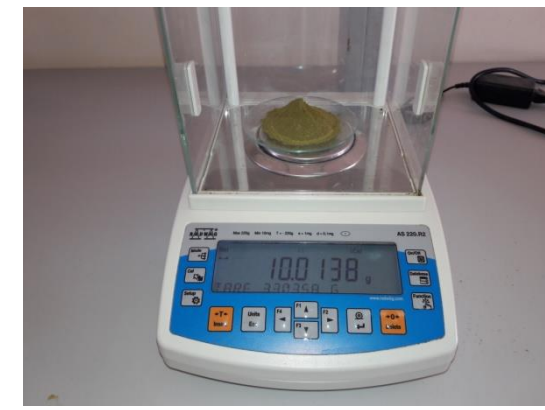

*Yogita, C., Rekha, S., Singhal.(2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (Areca catechu L.) and optimization study using response surface methodology.Innovative Food Science and Emerging Technologies 17, 106-113.*

### Z

*Zern TL, Wood RJ, et al. 2005.Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress.. J Nutr. Aug;135(8):1911-7.*

# **Annexes**

## Annexe I: les Matériels utilisés

Matériels utilisés	Illustration
Evaporateur de type Rotavapor BUCHI Haeting bath R-491 ( <b>photo originale</b> ).	
Spectrophotomètre de type UVmini-1240 SHIMADZU ( <b>photo originale</b> ).	
Balance analytique( <b>photo originale</b> )	
Étuve de type LAB TECH modele LIB-060 M ( <b>photo originale</b> ).	

Chromatographique













Centrifugeuse



Autoclave



## Annexe II: résultats des tests phytochimiques

	la variété <i>mokrani blanc</i> (MB)	la variété <i>ahmerbouamer</i> (AB)
<b>Test polyphénol</b>		
<b>Test des saponines</b>		
<b>Test de tannins</b>		
<b>Test des flavonoïdes</b>		
<b>Test des Alcaloïdes</b>		

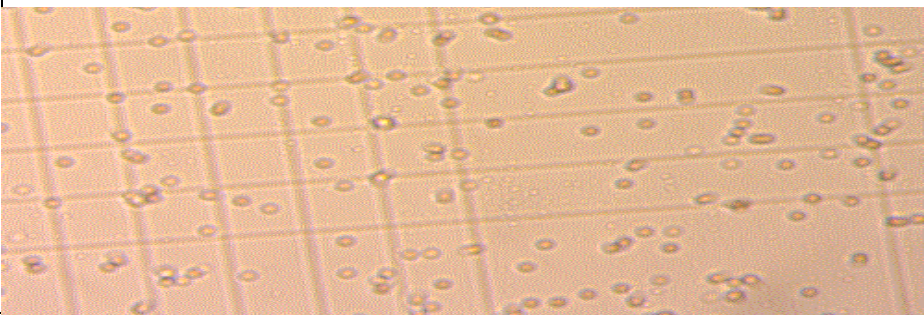
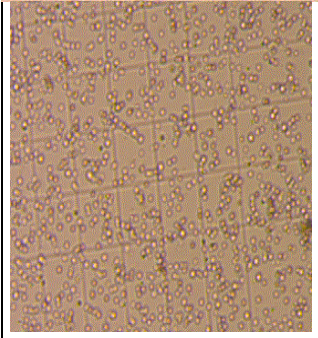
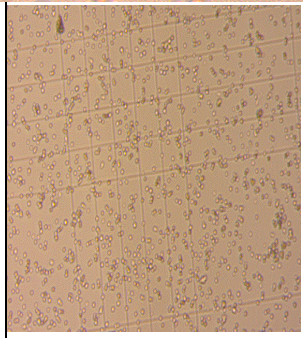






**Annexe II:** les différents standards des étalons utilisé pour HPLC.

المركب	tr	المعادلة	R2
Gallic acid	5.29	$y = 54681x$	$R^2 = 0.9956$
Chlorogenic acid	13.392	$y = 21665x$	$R^2 = 0.9853$
vanilic acid	15.531	$y = 65077x$	$R^2 = 0.9921$
Caffiec acid	16.277	$y = 84066x$	$R^2 = 0.9974$
vanilin	21.46	$y = 58930x$	$R^2 = 0.9966$
p-Coumaric acid	23.817	$y = 49495x$	$R^2 = 0.9961$
Rutin	28.37	$y = 28144x$	$R^2 = 0.9869$
Narginig	34.788	$y = 19379x$	$R^2 = 0.9968$
Quercetin	45.047	$y = 45378x$	$R^2 = 0.9962$

Lamda = 268nm

**Annexe III:** l'activité antifongique des feuilles de *vitis vinifera* sur les espèces de *Candida.sp* testées.

Td'incubation	les souches fongiques		
	Candida albicans	Candida tropicalis	Candida glabrata
<b>T<sub>0</sub></b>			
<b>T<sub>48</sub> témoin</b>			
<b>T<sub>48</sub> extrait MB</b>			
<b>T<sub>48</sub> extrait AB</b>	