



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار-عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN
SCIENCES

Spécialité : BIOLOGIE VÉGÉTALE

Intitulée

**EFFET DE LA NATURE DU SOL SUR LA TENEUR EN ANTIOXYDANTS
DE QUELQUES VARIÉTÉS DE RAISIN DE LA RÉGION D'EL-TARF**

Présentée par : DERRADJI-BENMEZIANE Farida

Membres de jury :

SERIDI Ratiba (Pr.)	Présidente	Université Badji Mokhtar - Annaba
DJAMAI Rachid (Pr.)	Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar - Annaba
BORDJIBA Ouahiba (Pr.)	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
SOLTANE Mahmoud (Pr.)	Examineur	Université Chadli Bendjedid - El-Tarf
BENSAID Rabah (Pr.)	Examineur	Université 20 Août 1955 - Skikda
SLIMANI Ali (Dr.)	Examineur	Université Chadli Bendjedid - El-Tarf

Année universitaire : 2014/2015

A la mémoire de mon père...

A la mémoire de ma mère...

A mes filles

A mes frères et sœurs

A mon mari

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu tout puissant de m'avoir donné la volonté et la santé pour terminer ce travail.

Une thèse, tant nominative soit elle, est avant tout un travail de réflexion collective, donc au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation.

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **DJAMAI Rachid** pour avoir accepté mon encadrement dans ma thèse de doctorat. Je le remercie d'abord pour ses qualités humaines, pour l'attention qu'il m'a accordée à la direction, à l'orientation et à la réalisation de mes travaux de recherches ; sa contribution à la rédaction du présent manuscrit, et surtout pour ces encouragements, qui m'ont été d'une précieuse aide; qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.*

*Je tiens à remercier Madame **SERIDI Ratiba**, Professeur à l'Université d'Annaba, et présidente de cet honorable jury, de m'avoir accepté dans son laboratoire pour la réalisation d'une partie de mes travaux de thèse et la mise à ma disposition du matériel et réactifs nécessaire pour cette fin et surtout pour ses conseils, ses critiques constructives qui m'ont été très utiles pour mener ce travail.*

*Je suis très honorée que Monsieur **SOLTANE Mahmoud**, Professeur à l'université d'El-Tarf, ait voulu accepter de faire partie du jury et je le remercie également pour son aide et son orientation.*

*A Madame **BORDJIBA Ouahiba**, Professeur à l'Université d'Annaba, qui a accepté d'examiner mes résultats et de participer au jury, je lui exprime mes très sincères remerciements.*

*Mes vifs remerciements pour Monsieur **SLIMANI Ali**, Docteur à l'université d'El-Tarf, qui a bien voulu accepter de valoriser et de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **BENSAID Rabah**, Professeur à l'université de Skikda qui a accepté d'examiner mes résultats et de faire partie de cet honorable jury.*

*Je remercie Monsieur, **CADOT Yves**, Docteur à l'institut INRA d'Anger (France) qui a bien voulu accepter la charge de codiriger cette thèse et la réalisation des analyses pour HPLC ; sa rigueur, ses suggestions nombreuses et ses conseils éclairés m'ont été d'un précieux concours pour valoriser les résultats obtenus et à la rédaction des articles. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères pour tout le temps qu'il m'a consacré (sa rigueur scientifique sans faille m'a remis de nombreuses fois dans le droit chemin). J'espère pouvoir continuer à collaborer avec lui.*

J'adresse également mes remerciements aux agriculteurs qui m'ont fourni les échantillons de raisin. Je tiens plus particulièrement à saluer Monsieur Ayad et Kamel pour leur générosité et leurs qualités humaines.

Mes remerciements vont enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et je souhaite que cette thèse puisse être un support assez valorisant et profitable pour ceux qui auront à l'utiliser.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Listes des tableaux et Figures

Résumés

INTRODUCTION GENERALE 01

CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Botanique et importance de la vigne	04
2. Vignoble de l'Algérie.....	05
3. Conduite et phénologie de la vigne	05
3.1 Cycle de développement de la vigne	06
3.2 Développement et maturation des baies de raisin	06
3.3 Composition des baies de raisin	10
4. Notion du stress oxydatif	13
4.1 Définition.....	13
4.2 Principaux radicaux libres oxygénés	13
4.3 Source des espèces réactives de l'oxygène.....	14
4.4 Rôles des radicaux libres oxygénés dans la physiologie	15
4.5 Dégâts cellulaires.....	15
4.5.1 Peroxydation lipidique	15
4.5.2 Oxydation des protéines.....	16
4.5.3 Dommage de l'ADN	16
5. Antioxydants des raisins	17
5.1 L'acide ascorbique.....	17
5.1.1 Propriétés antioxydantes.....	17
a) Neutralisation des radicaux libres.....	17
b) Régénération des tocophérols.....	18
5.2 Les caroténoïdes	19
5.2.1 Structure	19
a) Les carotènes	19
b) Les xanthophylles	19
5.2.2 Propriétés antioxydantes.....	21

a) Piégeage de l'oxygène singulet	21
b) Piégeage des radicaux libres	21
5.3 Les composés phénoliques	22
5.3.1 Généralités biochimiques	22
5.3.2 Propriétés antioxydantes.....	24
5.3.3 Rôles et intérêts des composés phénoliques	25
a) Chez les végétaux	25
b) Chez les humains.....	26
c) Pour l'industrie.....	26
d) Dans la régénération des sols pollués.....	26
5.3.4 Principaux composés phénoliques du raisin.....	27
a) Les composés non-flavonoïdes.....	27
b) Les composés flavonoïdes.....	29
6. Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques	39
6.1 Le climat.....	39
a) Lumière.....	40
b) Température.....	41
6.2 Le sol	42
a) Alimentation hydrique de la vigne	42
b) Nutrition azotée de la vigne	43

CHAPITRE II. MATERIEL & METHODES

1. Origine des échantillons étudiés.....	45
2. Parcelles échantillonnées	46
3. Analyse physico-chimique des échantillons de sol.....	48
4. Caractéristiques climatiques de l'année de récolte des échantillons	51
5. Récolte des baies de raisins.....	53
6. Analyses physico-chimiques des jus de raisins	55
7. Dosage des antioxydants sur les baies entières (raisins frais)	55
7.1 L'acide ascorbique.....	55
7.2 Les caroténoïdes	55
7.3 Les polyphénols.....	56
7.3.1 Extraction des composés phénoliques	56
7.3.2 Simplification et validation de la méthode d'extraction des polyphénols	56
a) Comparaison des quatre solvants	57
b) Optimisation du temps d'extraction	57
c) Optimisation de la température d'extraction	58

d) Optimisation du nombre d'extraction successive.....	59
e) Conclusion.....	59
7.3.3 Dosage des composés phénoliques des raisins frais.....	59
a) Dosage des PPT par le réactif de Folin-Ciocalteu.....	60
b) Dosage des FT.....	60
c) Détermination de l'activité antioxydante (PR).....	60
8. Analyse des composés phénoliques des pépins et pellicules.....	61
8.1 Extraction à partir des pellicules.....	61
8.2 Extraction à partir des pépins.....	61
8.3 Dosage des anthocyanes totales.....	62
8.4 Dosage des tanins totaux.....	63
8.5 Caractérisation de la composition phénolique des extraits bruts.....	64
8.5.1 Anthocyanes et flavonols par HPLC.....	64
8.5.2 Caractérisation des polymères de flavan-3-ols (tanins).....	65
a) Fractionnement des tanins.....	65
b) Thiolyse et dosage par HPLC.....	66
9. Analyse statistiques des données.....	68

CHAPITRE III. RESULTATS & DISCUSSION

1. Etude des composantes agro-pédologiques des différents sites.....	69
1.1 Interprétation du pH et de la conductivité électrique (CE) du sol.....	69
1.2 Interprétation de la densité réelle, apparente et de porosité.....	70
1.3 Interprétation de la matière organique et du rapport C/N.....	71
1.4 Interprétation du calcaire total et actif.....	72
1.5 Interprétation de l'analyse granulométrique.....	72
2. Propriétés physico-chimiques des jus des raisins analysés.....	75
2.1 pH et acidité.....	75
2.2 Degré Brix et densité.....	75
3. Antioxydants des raisins frais.....	76
3.1 Acide ascorbique.....	76
3.2 Caroténoïdes totaux.....	77
3.3 Composés phénoliques.....	79
3.3.1 Polyphénols totaux (PPT).....	79
3.3.2 Flavonoïdes totaux (FT).....	81
3.3.3 Activité antioxydante (PR).....	82
4. Antioxydants des pellicules et pépins.....	84

4.1 Anthocyanes	84
4.2 Flavonols	92
4.3 Tanins	98
5. Analyse en composantes principales et son interprétation.....	108
5.1 Analyse en composantes principales des résultats d'analyse du sol	109
5.1.1 Matrice de corrélation.....	109
5.1.2 Choix de composantes principales	109
5.1.3 Définition des composantes principales	109
5.1.4 Représentation graphique de l'ACP	111
5.2 Analyse en composantes principales des anthocyanes de pellicule	113
5.2.1 Matrice de corrélation.....	113
5.2.2 Choix de composantes principales	113
5.2.3 Définition de composantes principales.....	114
5.2.4 Représentation graphique de l'ACP	114
5.3 Analyse en composantes principales des résultats d'analyse HPLC des flavonols et tanins des pellicules et des pépins	116
5.3.1 Matrice de corrélation.....	116
5.3.2 Choix de composantes principales	117
5.3.3 Définition de composantes principales.....	117
5.3.4 Représentation graphique de l'ACP	118
Conclusions et perspectives	120
Références bibliographiques	124
Annexes	

Liste des abréviations

Anth. Acét : anthocyanes acétylées
Anth. Coumar : anthocyanes coumaroylées
Anth.Coum-acét : anthocyanes coumaroylées – acétylées
ATL : Anthocynes Totales Libres
CE : Conductivité électrique
DPm : Degré de Polymérisation Moyen
EAA : Équivalents en acide ascorbique
EAG : Équivalent acide gallique
EC : Équivalent catéchine
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
F3'5'H: flavonoid-3',5'-hydroxylase,
F3'H: flavonoid-3'-hydroxylase
FT : Flavonoïdes Totaux
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
PAL: Phenyl Ammonia Lyase,
PPT : Polyphénols Totaux
PR : Pouvoir Réducteur
TFA : Acide trifluoroacétique
UFGT: UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase,

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
I	Propriétés biologiques des quelques composés phénoliques dans l'organisme	25
II	Caractéristiques viticoles et topographiques des parcelles expérimentales	48
III	Données climatiques de la région de prélèvement des échantillons	51
IV	Gradient linéaire utilisé pour la séparation des flavonols et anthocyanes	64
V	Gradient linéaire utilisé pour la séparation des flavan-3-ols	68
VI	Echelle d'interprétation du pH	69
VII	Echelle d'interprétation de la conductivité électrique	70
VIII	Echelle d'interprétation du pourcentage de la porosité des sols	70
IX	Echelle d'interprétation du taux de matière organique selon la teneur en argile en viticultur	71
X	Echelle d'interprétation du C/N des résidus organiques, la minéralisation et la disponibilité de l'azote pour les plantes	71
XI	Echelle d'interprétation des teneurs en calcaire total des sols	72
XII	Composition granulométrique des sols et texture correspondante	73
XIII	Caractéristiques physico-chimiques des sols des différentes parcelles étudiées	73
XIV	Propriétés physico-chimiques des jus de raisin	76
XV	Teneurs en acide ascorbique et en caroténoïdes totaux des différentes variétés de raisin	77
XVI	Teneurs en différentes fractions d'anthocyanes détectées dans les extraits de pellicules des échantillons de raisins étudiés	87
XVII	Teneur en différents flavonols des extraits de pellicules	94
XVIII	Le DPM et teneur en tanins totaux des extraits de pellicules et de pépins	101
XIX	Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux	109
XX	Coefficient de corrélation (Pearson "r") entre les variables (paramètres physico-chimiques du sol)	110
XXI	Rapport de corrélation entre les variables et les facteurs (composantes principales)	111
XXII	Coefficient de corrélation (coefficient de Pearson "r") entre les variables	113
XXIII	Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux	114
XXIV	Corrélation entre les variables les facteurs (axes principaux)	114
XXV	Coefficient de corrélation (Pearson "r") entre les variables	116
XXVI	Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux	117
XXVII	Corrélation entre les variables les axes factoriels (composantes principales)	117

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Le développement d'une baie de raisin	7
2	Courbe de développement du raisin et d'accumulation de sucres, d'acide malique et acide tartrique	8
3	Structure d'une baie de raisin mûre partiellement sectionnée sur l'axe	11
4	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie	15
5	Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération	18
6	Régénération des tocophérols via l'action de l'acide ascorbique	18
7	Structure chimique des principaux caroténoïdes des raisins	20
8	Voie biochimique qui mène aux principales classes de polyphénols solubles présents dans la baie de raisin	22
9	Structure des acides phénoliques du raisin	28
10	Structures chimiques de quelques stilbènes	29
11	Structure de base des flavonoïdes comportant deux cycles benzéniques reliés par oxygène contenant un cycle pyrène	30
12	Structure aglycone des flavonols du raisin	30
13	Structure des principales anthocyanes du raisin	31
14	Spectre d'absorbance des anthocyanes rouges purifiées dans des solutions tampons pH 1.0 et pH 4.5	32
15	Formes structurales des anthocyanes prédominantes à différents pH	33
16	Évolution de la proportion des différentes formes des anthocyanes extraites des pellicules de cabernet sauvignon en fonction du pH	34
17	Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés	35
18	Structure de l'(-)-épicatéchine-3- <i>O</i> -gallate.	36
19	Unités monomériques des proanthocyanidines	36
20	Exemples de proanthocyanidines de type B et A des raisins	37
21	Structure générale des proanthocyanidines	38
22	Voie de biosynthèse des principaux flavonoïdes présents dans les baies	39
23	Localisation de région d'échantillonnage	45
24	Diagramme ombrothermique de la région d'étude pour l'année 2012	52
25	Variétés de raisins prélevés et leurs caractéristiques	54
26	Influence du type de solvant et du rapport alcool/eau sur l'extraction des PPT	57
27	Influence du temps sur l'extraction des PPT	58
28	Influence de la température sur l'extraction des PPT	58
29	Influence du nombre d'extraction successive sur le taux de PPT extraits	59
30	Fractionnement d'un trimère par thiololyse	66

31	Relation linéaire entre les caroténoïdes totaux et la CE (a) ; les caroténoïdes totaux et le calcaire total (b)	78
32	Teneurs en PPT et FT des différents cépages de raisins	80
33	Corrélation entre la teneur en PPT et FT des extraits méthanoliques du raisin	81
34	Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques du raisin	82
35	Corrélation entre PR et teneurs en PPT (a) , FT (b) , caroténoïdes (c) et vitamine C (d)	84
36	Formation de composés anthocyanine-méthylméthine-favanol par réaction entre le (+)-catéchine et de malvidine-3-O-glucoside	86
37	Teneurs en différentes anthocyanes (%) des pellicules des différentes variétés de raisin analysées	87
38	Profils chromatographiques des anthocyanes pelliculaires identifiées dans le Gros noir (A) , Cardinal 2 (B) , Muscat noir (C) , Cardinal 1 (D) enregistrés à 520 nm.	91
39	Corrélation entre le PR et les teneurs en ATL (a) et en PPT (b) des raisins	92
40	Profil chromatographique des flavonols des extraits de pellicules Gros noir (A) , Cardinal 2 (B) , Muscat noir (C) enregistré à 360 nm.	96
41	Profil chromatographique des flavonols des extraits de pellicules Cardinal 1 (D) , Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistré à 360 nm	97
42	Corrélation linéaire entre le PR et la teneur flavonols totaux des extraits pelliculaires	98
43	Teneurs en épicatechin-3-O-gallate et épigallocatechine des pépins (ECGpp et EGCpp) et des pellicules (ECGpl et EGCpl) des différentes variétés de raisins analysées	102
44	Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits pelliculaires du Gros noir (A) , Cardinal 2 (B) , Muscat noir (C) enregistrés à 280 nm	103
45	Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits pelliculaires Cardinal 1 (D) , Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistrés à 280 nm	104
46	Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits de pépins du Gros noir (A) , Cardinal 2 (B) , Muscat noir (C) enregistrés à 280 nm	105
47	Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits de pépins du Cardinal 1 (D) , Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistrés à 280 nm	106
48	Relation linéaire entre le PR et les teneurs en tanins totaux des pellicules	107
49	Cercle des corrélations et projections des individus dans le plan factoriel F1 - F2	112
50	Projection des variables (cercle des corrélations) et projections des individus (variétés) dans le plan factoriel F1 - F2	115
51	Cercle des corrélations et distribution des individus dans le centre de l'axe orthogonal formé par les composantes F1 et F2	119

Résumé : Effet de la nature du sol sur la teneur en antioxydants de quelques variétés de raisin de la région d'El-Tarf

Parmi les fruits les plus riches en antioxydants figure le raisin (*Vitis vinifera*). Ce fruit est largement consommé en tant que tel ou utilisé dans la production industrielle de jus et confiture.

Un objectif de ce travail était d'évaluer le raisin en tant que source d'antioxydants en comparant cinq variétés de raisins qui sont très répandues dans la région d'El-Tarf : Cardinal, Gros Noir, Muscat noir, Muscat blanc et Victoria, prélevées sur différents sites ; et de déterminer l'effet du site d'implantation sur cette teneur. Un autre but était de développer une procédure d'extraction permettant l'obtention de hauts rendements en composés antioxydants et garantissant la stabilité de ceux-ci.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la texture et les propriétés physico-chimiques des sols échantillonnés et caractérisé les jus de raisin sur le plan physico-chimique. Dans un second temps, nous avons caractérisé les extraits obtenus par macération de raisin frais, par spectrophotométrie, et ceux de pellicule et pépins séparément, par la chromatographie liquide haute performance (HPLC), au niveau de diverses classes de molécules antioxydantes.

Les extraits des raisins frais ont montré leurs richesses en polyphénols et caroténoïdes. Les pellicules sont caractérisées par la présence des anthocyanes (pour les variétés colorées) et de flavonols, molécules absentes dans les pépins qui, quant à eux, caractérisés par des teneurs importantes en proanthocyanidines. Le Gros noir a présenté le contenu le plus élevé en polyphénols totaux, flavonoïdes et caroténoïdes avec une activité antioxydante, mesuré par le pouvoir réducteur, la plus élevée, ce qui permet de classer cette variété au premier rang par rapport aux autres variétés étudiées.

En conclusion, les extraits de raisins (baie entière, pellicule et pépin), obtenus par macération dans un mélange eau – alcool, possèdent de nombreuses qualités tant au niveau nutritionnel qu'au niveau de la protection santé. Ces extraits, riches en composés phénoliques et possédant une haute activité antioxydante, peuvent potentiellement être utilisés comme source naturelle d'antioxydants. Le contenu en composés antioxydants varie non seulement avec les variétés mais également avec la nature du sol d'implantation notamment sa capacité de rétention d'eau.

Mots clés : Raisin de table, Composés bioactifs, Activité antioxydante, Sol, HPLC.

Abstract: Effect of soil type on the antioxidant content of some grape varieties in the region of El-Tarf

Among the most antioxidant-rich fruits include the grape (*Vitis vinifera*). This fruit is widely consumed as such or used in the industrial production of juice and jam.

An objective of this study was to evaluate the grapes as a source of antioxidants by comparing five varieties of grapes that are widespread in the El-Tarf region: Cardinal, Gros Noir, Muscat noir, Muscat blanc et Victoria, taken from different sites and to determine the effect of implantation site on this content. Another objective was to develop an extraction procedure for obtaining high yields of antioxidants and ensuring stability thereof.

Initially, we determined the texture and physicochemical properties of soils sampled and characterized grape juice on the physicochemical level. Secondly, we characterized the extracts obtained by maceration of fresh grapes, by spectrophotometric methods, and those of skin and seeds separately, by high performance liquid chromatography, for their content in various classes of antioxidant molecules.

Extracts from fresh grapes showed higher contents in polyphenols and carotenoids. The skins are characterized by the presence of anthocyanins (for colored varieties) and flavonols, molecules which are absent in the seed that, in turn, characterized by significant levels of proanthocyanidins. The Gros noir presented the highest total polyphenol, flavonoids and carotenoids content with the highest antioxidant activity, measured by reducing power, which allows us to classify this variety at the forefront compared to other varieties studied.

In conclusion, the grape extracts (whole berry, skin and seed) obtained through extraction by maceration in water – alcohol mixture, exhibit high content in phenolic compounds and possess high antioxidant activity can potentially be used as natural source of antioxidant for their interesting properties for health-protection. The content of antioxidant compounds varies not only with varieties but also with the nature of the implantation site including its water retention capacity.

Keywords: table grapes, bioactive compounds, antioxidant activity, Soil, HPLC.

الملخص: تأثير نوع التربة على محتوى المضادات للأكسدة لبعض أصناف العنب في منطقة الطارف

من بين أكثر الفواكه الغنية بمضادات الأكسدة يظهر العنب. يتم استهلاك هذه الفاكهة على نطاق واسع على هذا النحو أو تستخدم في الإنتاج الصناعي للعصير و المربى.

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم العنب كمصدر لمضادات الأكسدة من خلال مقارنة خمسة أصناف من العنب التي يتم غرسها في منطقة الطارف الا و هي: الكاردينال، غرو نوار، المسكا نوار، المسكا بلون و فيكتوريا التي أخذت من مواقع مختلفة، وتحديد تأثير موقع الغرس على هذا محتوى من مضادات الأكسدة. هدف آخر لهذه الدراسة كان تطوير عملية الاستخلاص للحصول على عوائد عالية من المواد المضادة للأكسدة وضمان استقرارها. أخيراً، علاوة على وصف هذه الفاكهة، الهدف الآخر من هذه الدراسة كان أيضاً المقارنة بين الأجزاء المختلفة لهذه الفاكهة (حبة الفاكهة كاملة، القشرة والبذور) في ما يتعلق محتواها من مضادات الأكسدة.

كخطوة أولى، حددنا الملمس والخصائص الفيزيائية والكيميائية لعينات التربة وميزنا عصير العنب على مستوى الخصائص الفيزيائية والكيميائية.

في الخطوة الثانية، ميزنا مستخلصات حصلنا عليها عن طريق نقع العنب طازج، بطرق طيفية، القشرة والبذور بشكل منفصل، بطريقة الكروماتوغرافيا، فيما يخص الفئات مختلفة من الجزيئات المضادة للأكسدة. أظهرت مستخلصات العنب الطازج غناها في البوليفينولات والكاروتينويد. تتميز القشرة بوجود الانثوسيانين (للأصناف الملونة) ومركبات الفلافونول، غائبة في جزيئات البذور التي، بدورها، تتميز بمستويات كبيرة من بروانتسيانيدين. الصنف غرو نوار أظهر أعلى نسبة من البوليفينولات، الفلافونويد والكاروتينويد مع محتوى النشاط المضادة للأكسدة، التي قيست عن طريق قوة الارجاع الأعلى والذي يسمح بترتيب هذا الصنف في الطليعة بالمقارنة مع الأصناف أخرى المدروسة.

في الختام، فإن مستخلصات العنب (حبة العنب كاملة، القشرة والبذور) التي حصلنا عليها بالنقع في مزيج الماء - الكحول، لديها العديد من الفوائد سواء على مستوى التغذية والحماية الصحية. هذه المستخلصات الغنية بالمركبات الفينولية و التي تتميز بقوة ارجاع عالية، يمكن أن تستخدم كمصدر طبيعي لمضادات الأكسدة. محتوى المركبات المضادة للأكسدة يختلف ليس فقط مع أصناف العنب ولكن أيضاً مع طبيعة التربة في موقع الزرع بما في ذلك القدرة على الاحتفاظ بالمياه

الكلمات المفتاحية: عنب المائدة، المركبات النشطة بيولوجيا، النشاط المضاد للأكسدة، التربة، الكروماتوغرافيا عالية الاداء.

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Historiquement, les hommes ont toujours puisé dans la nature de quoi se nourrir, se vêtir et se soigner. Sur terre, quatre personnes sur cinq se servent des plantes pour conjurer leurs maux ; quatre femmes sur cinq, en particulier dans les pays émergents, ne disposent d'aucun autre type de remède pour leurs enfants. En Afrique, en Asie et en Amérique latine, nombreux sont les pays qui font appel à la médecine traditionnelle pour répondre à certains de leurs besoins au niveau des soins de santé primaire. En Afrique, jusqu'à 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle pour se soigner.

De nombreuses études ont indiqué que les personnes consommant une alimentation riche en fruits et légumes présentent moins de maladies liées au vieillissement comme la maladie d'Alzheimer (**Joseph et al., 2009**).

Aujourd'hui, la santé occupe comme jamais auparavant un rang important. Dans un monde où les effets préjudiciables de la préparation industrielle des aliments, de l'emploi excessif des conservateurs et des additifs alimentaires sont de plus en plus manifestes, les fruits et les légumes apparaissent désormais comme les symboles d'un mode de vie plus naturel et plus sain. Leurs multiples atouts santé sont liés à leur faible teneur calorique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. Les fruits et légumes sont aussi une source importante d'antioxydants tels que les composés phénoliques. Les composés phénoliques sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques et en réponse aux attaques de pathogènes. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Des phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique, caractéristique des tissus en voie de lignification, est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation, au niveau de la blessure, d'un tissu cicatriciel résistant aux infections dans le but de limiter la progression des pathogènes (**Bahorun, 1997**).

Les végétaux constituent des sources très importantes d'antioxydants dont l'efficacité est reconnue aussi bien pour la santé humaine que dans l'industrie agroalimentaire. Parmi ces végétaux, le raisin possède une spécificité par les composés phénoliques antioxydants qu'il renferme, comme les flavonols (quercétine), les stilbènes (resvératrol), les anthocyanes (cyanidine et autres) ou encore les tanins (catéchine). Sa composition phénolique a été étudiée par plusieurs auteurs, même s'il reste encore de nombreuses inconnues (**Yi et al., 1997** ;

Revilla et Ryan, 2000 ; Giovanelli et Brenna, 2007 ; Bail et al., 2008 ; Spranger et al., 2008). Ce fruit a fait l'objet de nombreuses études à travers le monde montrant sa richesse en produits antioxydants (**Davalos et al., 2005 ; Esna-Ashari et al., 2008 ; Breksa et al., 2010 ; Mulero et al., 2010**). Ces composés, par leurs propriétés antioxydantes conséquentes, pourraient diminuer les risques de thromboses et d'athérosclérose (**Freedman et al., 2001**)

De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires végétaux pour le développement de nouveaux médicaments. Les baies de *Vitis vinifera* sont utilisées depuis les temps anciens pour plusieurs fins, notamment le traitement du cancer des poumons et du foie, la dysenterie, les reins et la vessie ; et aujourd'hui ils sont d'un intérêt nutritionnel en consommation fraîche ou sèche ou sous forme d'extraits. Ainsi, les extraits des pellicules et pépins sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour leur propriété bénéfique sur la santé en raison des composés phénoliques et particulièrement leur teneur intéressante en resvératrol (**Bail et al., 2008**).

Il n'existe pas à ce jour de données d'ensemble sur la composition en antioxydants des raisins algériens. Composition extrêmement complexe puisque plusieurs composés ont été identifiés à ce jour. Parmi les composés les plus importants de la baie on trouve : les sucres, les acides organiques, les composés aromatiques et les composés phénoliques. Parmi ceux-ci on peut distinguer les anthocyanes, pigments responsables de la couleur rouge des baies qui sont localisés dans la pellicule des cépages à baies noires. Il y a aussi, les tanins qui sont essentiellement localisés dans la pellicule et les pépins. Leurs compositions dans les différentes variétés algériennes ne sont actuellement pas connues et dont la teneur dépend d'une multitude de facteurs notamment le climat, le type et les propriétés physico-chimiques du sol.

Dans ce contexte, les vignobles de la région d'El-Tarf colonisent des terrains qui ont des caractéristiques différentes. D'une part les conditions climatiques auxquelles ils sont soumis à des influences méditerranéennes, d'autre part ils sont implantés sur des sols de texture et caractéristiques diverses. En plus, cette région présente une collection de cépages offrant aux vigneronns la possibilité de faire des raisins typés et originaux. L'étude de l'incidence du sol sur la composition en antioxydants de la vigne et la qualité des raisins a été étudiée par de nombreux auteurs. Cependant, il n'y a pas eu de travaux réalisés sur les cépages régionaux du vignoble d'El-Tarf.

Ainsi, les objectifs de cette étude sont :

1. D'étudier l'impact du cépage sur la composition antioxydante des différents cultivars prélevés de la région d'El Tarf. Il s'agit de déterminer si la composition en antioxydants d'extraits de la baie, pellicules et pépins permet de discriminer différents cépages ;
2. Contribuer à constituer une base de données de la composition en antioxydants des raisins du vignoble de cette région la plus exhaustive possible ;
3. Déterminer la relation pouvant exister entre la teneur en antioxydants du raisin et la nature du sol et les conditions climatiques.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous suivrons une démarche en trois parties :

- La première partie est une étude bibliographique synthétisant les connaissances actuelles sur la baie de raisin, la structure et l'évolution au cours du développement du fruit ainsi que sur les antioxydants des raisins, leur propriétés antioxydantes et leur biosynthèse ;
- La deuxième partie est une description du matériel végétal ainsi que du matériel et des méthodes utilisés au cours de l'étude ;
- La troisième partie rapporte les résultats obtenus et leur discussion. Dans un premier temps, l'analyse physico-chimique du sol, l'analyse physico-chimique et la détermination de la teneur en composés des différents échantillons du raisin est présentée. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la détermination quantitative et qualitative (HPLC) des polyphénols des pellicules et pépins séparément.
- Enfin, une conclusion générale mettra l'accent sur les principaux résultats obtenus.

Ce travail a été mené sur des raisins cultivés en plein champ dans les diverses zones de la région d'El-Tarf sur cinq cépages. Les cépages "Cardinal", " Gros noir", " Muscat blanc", "Muscat noir" et "Victoria" ont été choisis. Cette étude sur les composés phénoliques est très originale à l'échelle de la région d'étude ; En effet, elle est la première réalisée sur des cépages cultivés dans cette région du pays.

Chapitre I.
Revue bibliographique

CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Botanique et importance de la vigne

La botanique classe les vignes dans la famille des vitacées. Toutes les vignes cultivées, ou sauvages, appartiennent au genre *Vitis*. Le raisin est le fruit de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*) originaire d'Europe, au sein de laquelle il existe différents cépages. Un cépage est une variété de vigne qui produit soit du raisin de table (Italia, Chasselas...) soit du raisin de cuve (Merlot, Chardonnay...). L'identification des cépages est basée sur l'observation des caractères morphologiques comme la couleur des baies et la forme des feuilles. Cette étude s'appelle l'ampélogie (**Renouf, 2006**). C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde. En effet, selon un rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) concernant le marché mondial du fruit, le raisin représente 14,6 % de la production mondiale de fruits juste après l'orange. Selon le rapport de mois de juin 2012 du département de l'agriculture des USA (USDA), la production mondiale de raisin de table est en croissance, ainsi l'année 2011/2012 est supérieure d'environ un demi million de tonnes par rapport à la campagne précédente, pour atteindre 16,5 millions de tonnes. La Chine est le principal marché responsable de cette croissance (du site : www.gifruit.com). Le raisin se présente sous forme de grappes composées de nombreux grains, qui sont sur le plan botanique des baies, de petite taille et de couleur claire, le raisin blanc (vert jaune, ou jaune doré), ou plus foncée : le raisin rouge (rosé, noir-violet). Il sert à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté (on parle dans ce cas de raisin de cuve), comme il peut se consommer comme fruit, soit frais, le raisin de table (Chasselas, Lavallée, Muscat de hampbourg, Cardinal, Italia...), soit sec, utilisé surtout en pâtisserie ou en cuisine. Il est également consommé sous forme de jus de raisin.

Il existe de très nombreuses variétés de vigne (appelées cépages): plus de 5 000 cépages sont ainsi répertoriés. Cependant, aujourd'hui, seuls environ 250 d'entre eux sont cultivés, avec des surfaces importantes, à des fins viticoles. Chaque cépage se distingue par les feuilles, les baies, les formes et les couleurs de grappes différentes (**Chira et al., 2008**).

Malgré sa grande importance économique dans le contexte mondial, la vigne n'est pas un modèle d'étude privilégié, et est finalement assez peu étudiée en regard de son importance économique. La vigne ne mobilise pas des moyens de recherche importants permettant d'aboutir rapidement à des avancées fondamentales dans la connaissance du végétal.

De nombreuses études restent à mener pour mieux comprendre les aspects fondamentaux de cette plante, sur sa physiologie et les interactions avec le milieu trophique et atrophique. Ces études permettraient de dégager les voies qui pourraient être utilisées pour améliorer les performances agronomiques de cette culture dans le cadre d'une viticulture raisonnée.

2. Vignoble de l'Algérie

Symbole, comme l'olivier, du paysage et de la civilisation méditerranéenne, la vigne est partie à la conquête du monde, elle est implantée partout où elle trouvait le climat physique et humain propice à son développement. Comme dans tous les vieux pays de civilisation méditerranéenne, la répartition actuelle et les caractéristiques essentielles des vignobles de l'Algérie résultent d'une longue histoire. Dans une région au passé riche et aussi troublé que celui de l'Algérie, toute étude viticole doit s'appuyer sur une reconstitution aussi précise que possible de l'évolution historique et aux différents bouleversements qu'a connu le pays.

L'Algérie offre par ses caractéristiques pédoclimatiques (nature du sol et ensoleillement) les conditions optimales pour la production de raisin. Les régions de production de raisins sont surtout situées au Nord du pays. On citera parmi ces régions : Arzew, Mostaganem, Mascara, Sidi-Belabes et Tlemcen à l'ouest, Boufarik, Médéa, Blida, Chéraga et Tipaza pour le centre. Selon les estimations de la **FAO**, le vignoble algérien s'étend sur une superficie de 69220 ha pour une production de 650000 tonnes (FAOSTAT data, 2010, 2011; <http://faostat.fao.org>).

3. Conduite et phénologie de la vigne

Les plants de vigne cultivés sont constitués d'une structure permanente, formée par le tronc et les racines pérennes, qui dure toute la vie de la plante et qui s'accroît chaque année. Une autre partie, aérienne et souterraine, repousse annuellement; elle est récupérée à la récolte sous la forme de grappes ou enlevée lors des interventions de conduite pour se recycler dans le sol. La conduite de la vigne consiste à amener la croissance des ceps, dans des formes et des limites géométriques définies par le viticulteur, par le biais des opérations culturales telles que la taille de formation et les tailles d'entretien. Plusieurs types de conduite existent pour la vigne; les systèmes les plus courants sont le Guyot, le Cordon de Royat, la Lyre, l'Espalier, le Gobelet, etc. Les types de taille les plus répandus sont la taille en Guyot double et la taille en Cordon de Royat (**Attia, 2007**).

Au cours de la saison de croissance, différentes techniques culturales sont mises en œuvre pour maîtriser le développement de la plante. L'épamprage est pratiqué pendant les premiers

stades de croissance pour éliminer les pousses non fructifères (gourmands) et de ce fait éviter la concurrence pour l'eau et les nutriments pour les pousses fructifères. L'écimage et le rognage sont des techniques accomplies plusieurs fois pendant la saison de végétation pour maintenir respectivement la hauteur, la largeur autorisées des haies et le rapport feuille/fruit qui est essentiel. L'effeuillage se pratique vers la véraison afin d'éliminer les feuilles et entre-cœurs situés dans la zone des grappes pour améliorer l'insolation, la température et l'aération des grappes afin de faciliter le mûrissement des raisins (**Attia, 2007**).

3.1 Cycle de développement de la vigne

Vitis vinifera L est une espèce à climat tempéré ne supportant pas les températures très basses et qui a besoin des températures moyennes de l'été pour la maturation de ses fruits. Le développement des baies commence à la pollinisation et se poursuit jusqu'à l'état de maturité. Il se traduit par une croissance en volume des baies s'accompagnant d'une évolution de la composition chimique du raisin (sucres, acides et composés phénoliques) et de modifications des propriétés physiques de la baie (**Renouf, 2006**).

3.2 Développement et maturation des baies de raisin

La grappe de raisin est un ensemble de fruits charnus de type baie portés par une rafle. Elle comporte donc une charpente (rafle) et le(s) fruit(s), grain ou baie. Cette structure particulière de raisin a son importance car c'est l'ensemble de cet organe qui, après la floraison et la nouaison, va évoluer jusqu'à la récolte. La croissance de la baie de raisin est caractérisée par deux courbes sigmoïdes successives, avec un plateau entre-deux, correspondant aux trois stades de développement (**Coombe, 1973**), selon des critères phénologiques, biochimiques et physiologiques (Fig. 1).

- Le développement herbacé ou végétatif après la nouaison, la formation de la baie (phase I);
- La véraison, correspond aux changements de texture (ramollissement) et de couleur (ambre pour les raisins blancs et rouge pour les noirs) (phase II) ;
- La maturation (phase III).

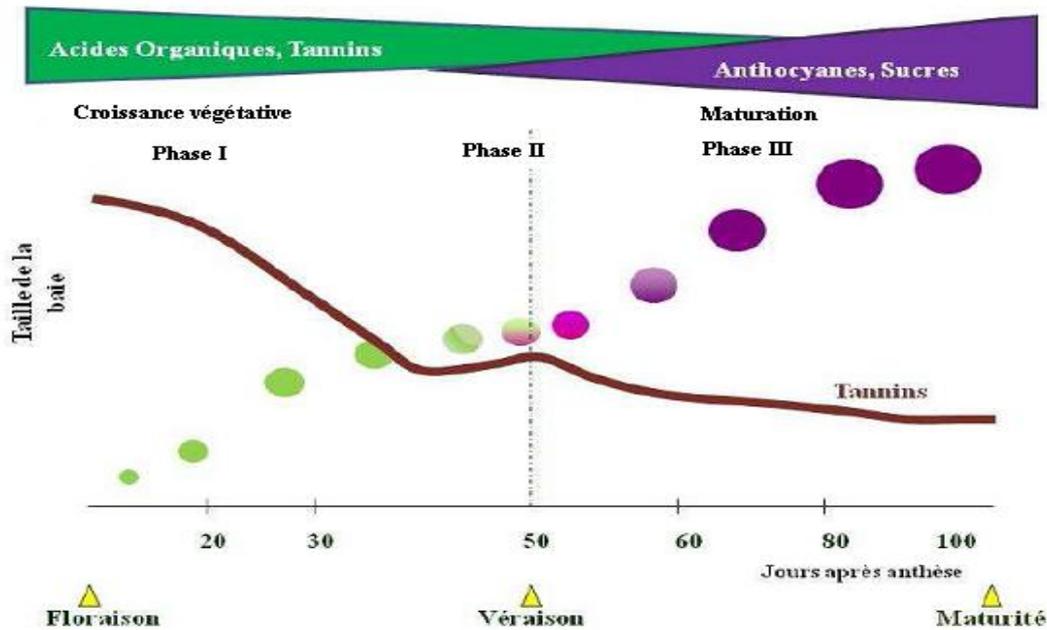


Figure 1. Le développement d'une baie de raisin (Coombe, 1973)

La taille finale du fruit est directement liée au nombre de cellules produites mais également par le nombre de pépins dans la période suivant immédiatement la pollinisation (May, 2000 ; Zhang *et al.*, 2006). L'étude de Fernandez *et al.* (2006) montre que la variabilité de la taille de la baie chez les cépages *Vitis vinifera L.* est pour la plus grande partie ne dépend que de la phase d'expansion cellulaire, alors que chez les vignes sauvages, cette variabilité dépend aussi bien de la phase d'expansion cellulaire que de la phase de multiplication cellulaire. La taille de la baie joue un rôle important sur le rapport de la teneur des extraits à partir des différentes composantes, essentiellement, la pellicule et les pépins (Roby et Matthews, 2004).

La première phase du développement des baies commence à partir de la floraison jusqu'à environ 60 jours après. Au cours de cette phase, se succèdent des phénomènes de division cellulaire qui ont eu lieu pendant les premières semaines, d'où la formation de la baie et des pépins, et le nombre des assises cellulaires constitutives de la baie sont déterminées (Harris *et al.*, 1968). Une augmentation de la taille des cellules, avec accumulation des solutés, a lieu au cours de cette phase. Plusieurs solutés s'accumulent et atteignent des niveaux maximums autour de la période véraison, les plus répandus sont les acides tartrique et malique (Fig. 2) (Possner et Kliever, 1985).

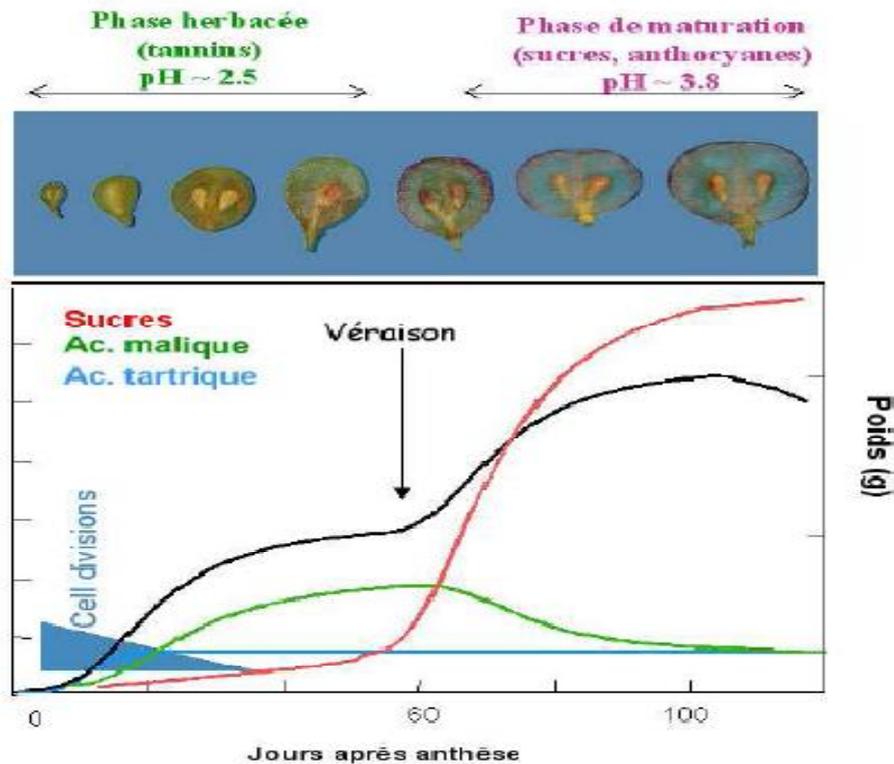


Figure 2. Courbe de développement du raisin et d'accumulation de sucres, d'acide malique et d'acide tartrique.

Les tanins s'accumulent au cours de la première phase (phase I), ils sont localisés au niveau de la pellicule et des pépins et presque absents dans la pulpe (**Kennedy *et al.*, 2000a**). La fin de cette période se caractérise par un ralentissement de la croissance de la baie. Les baies sont alors dures, vertes, grossissent peu et présentent une certaine activité photosynthétique. Au cours de cette phase, les acides hydroxycinnamiques s'accumulent. Ces composés sont distribués au niveau de la pulpe et de la pellicule ; ils jouent un rôle important dans la réaction du brunissement et ils représentent des précurseurs à la synthèse des phénols volatils (**Romeyer *et al.*, 1983 In Attia, 2007**).

D'autres composés s'accumulent ou sont biosynthétisés dans la baie tout au cours de la première période de la croissance tels que les éléments minéraux – macro et micro éléments (**Possner et Kliewer, 1985**), les acides aminés (**Stines *et al.*, 2000 In Attia, 2007**), et les précurseurs de certains composés aromatiques (méthoxy-pyrazines) (**Allen et Lacey, 1999 In Attia, 2007**).

La seconde phase (phase II) débute par une période de transition appelée véraison ; période durant laquelle les concentrations en solutés (notamment en acides tartrique et malique) sont maximales et l'accumulation des sucres et des anthocyanes débute (**Boss *et al.*, 1996**). Cette

phase est caractérisée par le ramollissement et la coloration de la baie (cépages rouges). Globalement, la baie double approximativement de taille entre le début et la fin de cette période.

La troisième phase (phase III) qui correspond à la maturation est caractérisée par une accumulation de sucres et de composés phénoliques tandis que les concentrations en acides organiques diminuent ; en revanche, les arômes s'accumulent uniquement durant la fin de cette phase de maturation (**Attia, 2007**).

Beaucoup de solutés qui se sont accumulées dans la baie de raisin pendant la première période de développement sont présents à la récolte, mais en raison de l'augmentation du volume des baies, leur concentration est considérablement réduite en termes de teneur par baie, non seulement par phénomène de dilution mais aussi en termes de cinétique de biosynthèse, principalement l'acide malique dont l'évolution varie considérablement mais peut être corrélée avec les conditions climatiques; les raisins cultivés dans les régions chaudes ont tendance à avoir moins d'acide malique que ceux cultivés dans les régions froides (**Kennedy, 2002**).

Le raisin est connu pour être un fruit acide. A la véraison, le niveau d'acidité est d'environ 450 mEq et le pH de 2,5 à 2,7. A maturité, le pH est d'environ 3.5, ou plus suivant les cépages et les conditions climatiques. L'acide malique, l'acide tartrique et leur balance acido-basique avec le cation K^+ , sont responsables de 90% de cette acidité. Enfin, les quantités d'acides organiques accumulées durant la phase herbacée diminuent et le pH augmente. Ceci est lié d'une part à la dégradation progressive de l'acide malique (**Possner et Kliever, 1985**), d'autre part à un effet de dilution des autres acides du fait de la croissance en volume des baies.

Dans les pépins, la teneur en tanins diminue cependant au cours de la phase de maturation. Cette diminution est liée au processus d'oxydation des tanins liés aux parois des pépins (**Kennedy et al., 2000b**). Par conséquent, la composition de l'extrait de tanins des pépins change considérablement avec une réduction relative des tanins responsable de l'amertume (**Kennedy, 2002**). Cependant, les quantités de tanins de la pellicule varient peu ou restent constants au cours de la deuxième phase de croissance ; mais leur nature change. Ces modifications étant liées à la taille de la baie. La qualité et la nature de l'extraction des

composés phénoliques sont étroitement liées à la composition en pectines et en anthocyanes de la pellicule (**Kennedy *et al.*, 2001**).

Les teneurs des baies en plusieurs composés aromatiques, tels que les monoterpènes et les méthoxypyrazines, dont la biosynthèse débute au cours de la première phase de croissance, diminuent au cours de la maturation du fruit pour se trouver à l'état de trace. Cette diminution semble être fonction de l'intensité de l'ensoleillement au niveau de la grappe (**Kennedy, 2002**).

3.3 Composition des baies de raisin

La baie peut être considérée comme une unité biochimique indépendante et complexe ; en plus, des métabolites primaires (eau, sucres, acides aminés, macro et micro-éléments) qui sont indispensables à la survie de l'organe, les baies de raisin ont la capacité de synthétiser d'autres composés tels que les aromatiques et phénoliques tels que, des terpènes (citrol, geraniol...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins (**Kennedy, 2002 ; Conde *et al.*, 2007**). La phase de multiplication cellulaire représente un facteur important de l'organogenèse de la baie, bien que la phase d'expansion cellulaire soit la plus déterminante pour la taille finale des baies ainsi que sa morphologie (**Cong *et al.*, 2002**).

Anatomiquement, la baie de raisin est composée de trois parties distinctes (Fig. 3):

- La pellicule contient essentiellement de l'eau puis des matières odorantes et colorantes (flavonols chez les cépages blancs, anthocyanes et flavonols chez les cépages rouges), mais aussi des tanins qui confèrent des propriétés anti diarrhéiques, et des matières pectiques qui rentrent dans la constitution des parois cellulaires ;
- La pulpe est constituée essentiellement d'eau, de sucres et d'acides. Ces derniers ont un rôle déterminant au niveau de l'élaboration, la conservation, et des qualités organoleptiques des jus et des vins ;
- Les pépins renferment des tanins (5 à 8% du poids des pépins) notamment des OPC (oligomères proanthocyanidiques), et des huiles (**Demelin, 2012**).

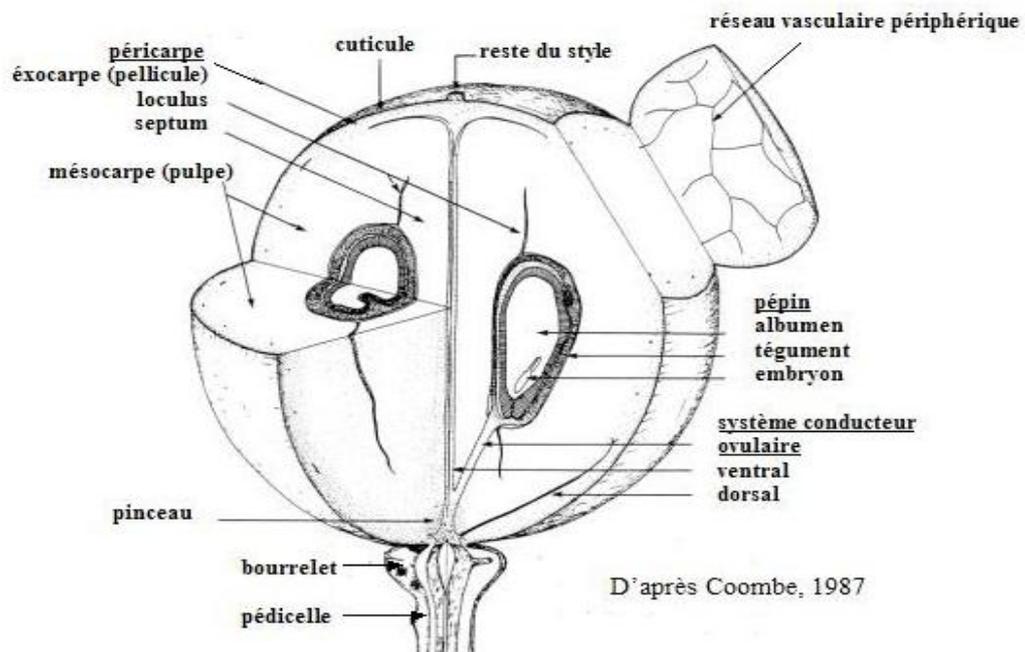
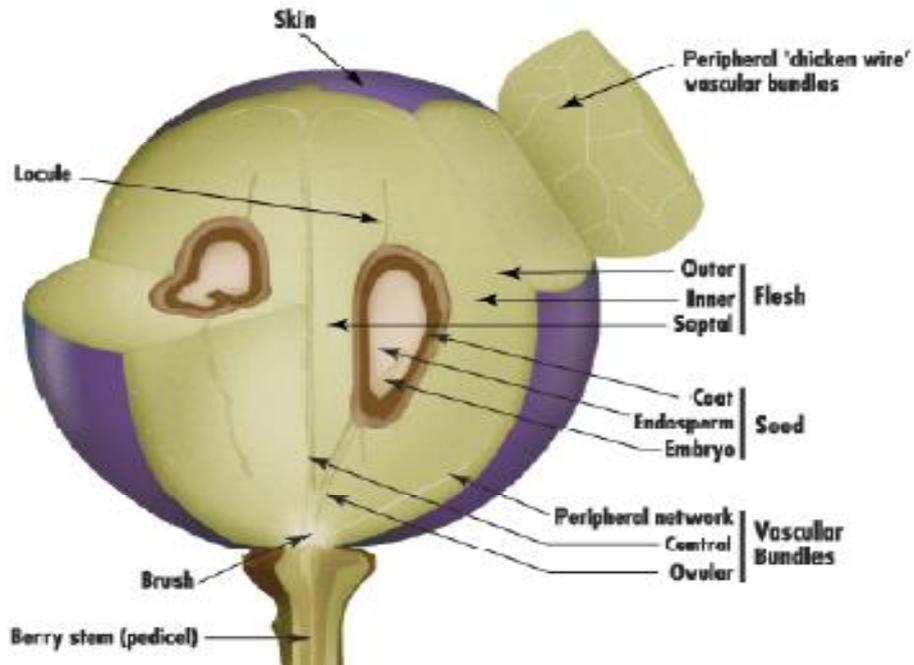


Figure 3. Structure d'une baie de raisin mûre partiellement sectionnée sur l'axe (Kennedy 2002 ; Deloire, 2008).

La composition chimique du grain de raisin évolue tout au long de sa maturation. On trouve essentiellement :

- **L'eau** : est de loin le constituant le plus abondant du raisin (75 – 85%) jouant le rôle d'un solvant des composés fixes et volatils. La teneur en eau provenant du sol, peut correspondre à près à 99 % de la teneur en eau de la baie. Un stress hydrique mène généralement à des baies de petite taille, puisque ce dernier inhibe la division cellulaire et plus particulièrement l'expansion cellulaire (**Conde et al., 2007**).
- **Les sucres** : la teneur en sucres au cours de la maturation est le facteur principal du degré de maturité des baies, déclenchant la récolte (**Conde et al., 2007**).
- **Les acides organiques** : mélange d'acide tartrique, d'acide malique, de traces d'acide citrique et de quelques autres acides (succinique, fumarique, etc...). Ce sont eux qui donnent aux raisins leur saveur rafraichissante et qui équilibrent leur saveur bien sucrée (**Demelin, 2012**).
- **L'acidité titrable (AT)** : est un facteur important de la qualité d'une vendange. Durant la maturation, l'acidité titrable des baies diminue, cette diminution étant principalement due à celle de l'acide malique (**Bisson, 2001**). Le rapport sucres / AT est prépondérant pour la détermination de l'indice de maturité des baies pour le déclenchement de la récolte (**Attia, 2007**).
- **La teneur en azote** : l'azote joue un rôle important sur la qualité des raisins. De la période allant de la véraison à la maturité, la teneur en azote total peut doubler ou tripler. Cependant, l'azote du raisin se présente principalement sous forme polypeptidique. Les principaux acides aminés sont la proline et l'arginine, bien que d'autres acides aminés soient présents (**Lafon-Lafourcade et Guimberteau, 1962**).
- **Les éléments minéraux** : du plus abondant au moins abondant : potassium, phosphore, calcium, magnésium, soufre (sous forme de sulfate), chlore, sodium, fer, zinc, cuivre, manganèse, fluor, nickel, chrome, cobalt, sélénium, iode. Le taux de sodium est faible mais comme il est associé à une forte teneur en eau (80%) cela va conférer au raisin des propriétés diurétiques exceptionnelles (**Demelin, 2012**).

- **Les composés phénoliques :** Les polyphénols sont des composés importants de la baie de raisin. Ils ont des propriétés antioxydantes puissantes, qui font du raisin, comme certains autres fruits, des produits d'intérêt particulier. Grâce à ces composés, il pourra être utilisé pour retarder le processus de vieillissement, abaisser le taux de cholestérol, lutter contre l'hypertension, protéger les vaisseaux sanguins, etc....

4. Notion du stress oxydatif

4.1 Définition

Il s'agit d'une oxydation des constituants des organismes due à un excès de molécules appelées radicaux libres venant de l'oxygène que nous respirons pour vivre.

Les *radicaux libres* sont des atomes ou groupes d'atomes ayant un nombre impair d'électrons sur la loge extérieure. Ils peuvent se former lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules. Très instables, ils réagissent rapidement avec les autres composants, pouvant capturer l'électron qui leur est nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'ils attaquent la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, la transformant elle-même en radical libre. Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN ou la membrane cellulaire, avec risque de multiplication anormale des cellules, entraînant un dysfonctionnement ou une mort cellulaire, un cancer (**Tanguy et Begué-Simon, 2009**). Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défenses. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydant / prooxydant est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (**Favier, 2003**).

4.2 Principaux radicaux libres oxygénés

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, appelés radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais pour *Reactive Oxygen Species*) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non-radicalaires très réactifs. Certaines espèces réactives

de l'azote (ERA ou RNS en anglais pour *Reactive Nitrogen Species*) sont parfois mentionnées comme appartenant à cette classification puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et qu'elles se comportent de manière similaire aux ERO vis-à-vis du stress oxydant (espèces généralement radicalaires, pouvoir oxydant important, générées et régulées par l'organisme) (**Pham-Huy et al., 2008**).

Les principaux radicaux libres comprennent : le radical hydroxyle (OH^\bullet), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le monoxyde d'azote (NO^\bullet), le dioxyde d'azote (NO^2), le nitroxyde (NOO^\bullet), le radical peroxy (ROO^\bullet) et le peroxy lipidique (LOO^\bullet). Citons en outre, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide nitreux (HNO_2), le peroxydinitrite (ONOO^-), le trioxyde de diazote (N_2O_3) et le peroxyde lipidique (lipoprotein lipid hydroperoxides ou LOOH), qui ne sont pas des radicaux libres au sens propre mais qui sont très réactifs et peuvent donc conduire à l'oxydation des molécules dans l'organisme (**Pham-Huy et al., 2008**).

4.3 Source des espèces réactives de l'oxygène

La source principale des ERO dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxysomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. Les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène, produisent également en permanence des ERO. Ces ERO sont particulièrement réactives et sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, ...). Au niveau moléculaire, les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies. Les ERO sont également générées sous l'effet des stress environnementaux comme la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme. Toutes ces situations provoquent une surproduction d'ERO dans notre organisme (**Favier, 2003 ; Alexeyev et al., 2004**). La figure 4 illustre les origines des différents radicaux libres oxygénés et des ERO impliquées en biologie d'après **Favier (2003)**.

Cependant, la principale source des ERO est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ERO cellulaires (**Balaban et al., 2005**).

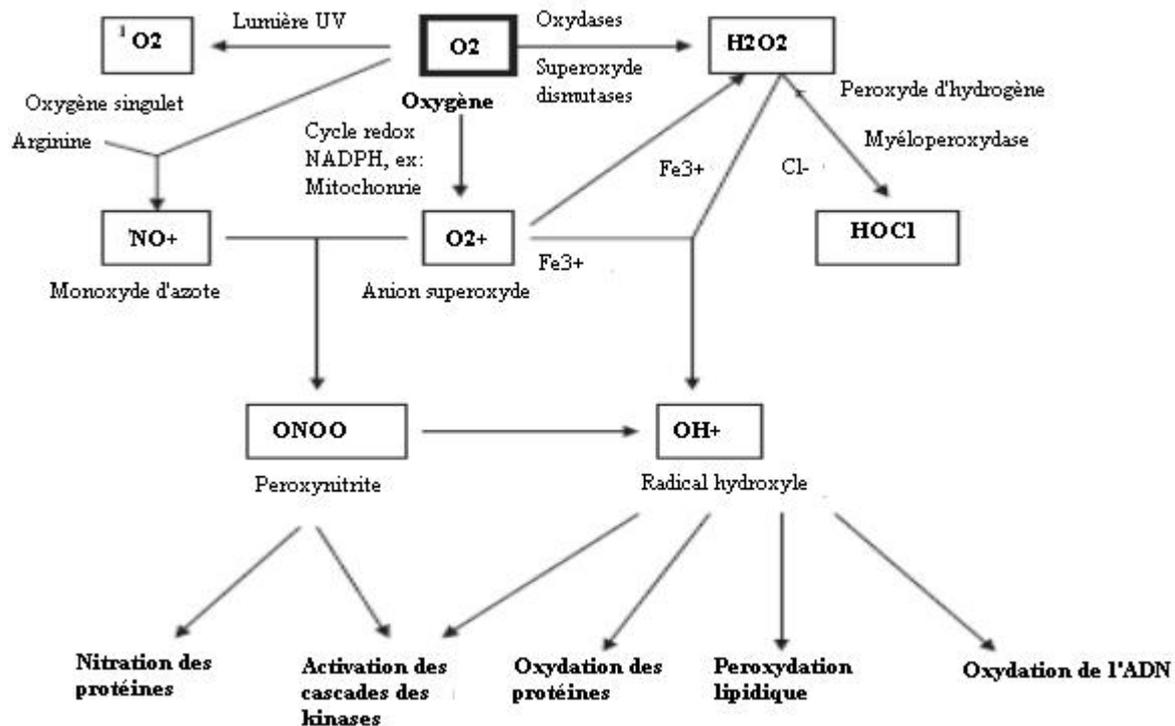


Figure 4. Origine des différents radicaux libres oxygénés et ERO impliqués en biologie (Favier, 2003)

4.4 Rôles des radicaux libres oxygénés dans la physiologie

Les Radicaux libres oxygénés présentent un paradoxe en ce qui concerne leur fonction biologique : d'une part, ils préviennent la maladie par l'implication du système immunitaire, médiation de la signalisation cellulaire et jouant un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager d'importantes macromolécules dans les cellules et peuvent intervenir dans la cancérogénèse et les maladies cardiovasculaires (Fang *et al.*, 2002).

4.5 Dégâts cellulaire

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation des lipides, de l'ADN, des protéines.

4.5.1 Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique causée par les ERO, est un phénomène général qui concerne tous les lipides contenant des acides gras polyinsaturés, quelle que soit leur origine (huiles, graisses, membranes cellulaires, lipoprotéines). La lipoperoxydation est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Favier, 2003 ; Atawodi, 2005). L'oxydation des lipides pose également de sérieux problèmes pour les industries agroalimentaires. Elle conduit à des modifications de goût, d'odeur et de couleur et par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments.

4.5.2 Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Les modifications oxydatives des protéines par les ERO provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (**Levine, 2002**). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui rompent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) celles qui modifient les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (**Levine, 2002**).

4.5.3 Dommage de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ERO. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (**Richter et al., 1988**). Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2°) sa localisation proche de la membrane interne, 3°) des mécanismes de réparations frustrés, 4°) la proximité d'ADN mitochondrial aux oxydants générés lors de la phosphorylation oxydative et 5°) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (**Cann et Wilson, 1983 ; Richter et al., 1988 ; Cortopassi et al., 1992; Ames et al., 1993**). L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un *feed-back* positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dues au vieillissement : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production des ERO et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production des ERO. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation des ERO provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (**Beckman et Ames, 1998**).

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

Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de contrôler et parfois réguler la production des ERO. Dans ces systèmes de défense, on inclut des composés antioxydants (glutathion, vitamines A, C et E, etc.), des oligoéléments (cuivre, zinc, sélénium, etc.) ainsi que des protéines (superoxyde dismutase, catalase, glutathion transférase, etc.) qui régulent la concentration des ERO. En tant qu'antioxydants exogènes, les polyphénols font partie des systèmes de défense contre le stress oxydant en intervenant à différents niveaux notamment, piégeage des ERO et chélation des métaux de transition tels que le Cu et le Fe responsable de la production des ERO.

5. Antioxydants des raisins

5.1 L'acide ascorbique

L'acide ascorbique est un nutriment essentiel, dont l'apport est assuré par les légumes et les fruits. La vitamine C existe sous forme réduite, l'acide ascorbique, et sous forme oxydée, l'acide déshydroascorbique. Le couple acide ascorbique/acide déshydroascorbique permet le transfert d'un ou deux électrons ; ainsi, la vitamine C intervient dans diverses réactions. L'effet antioxydant de l'acide ascorbique peut être direct, par inhibition des radicaux libres ou indirect par régénération des tocophérols. La teneur en vitamine C des raisins varie entre 4 à 5 mg/100g du poids frais.

5.1.1 Propriétés antioxydantes

a) Neutralisation des radicaux libres

L'acide ascorbique est un bon piègeur des espèces oxydantes tels que l'oxygène singulet (1O_2) et le radical peroxy (ROO°). Le radical libre (R°) est neutralisé par le transfert d'un électron à partir de l'acide ascorbique (AA). Il résulte un produit détoxifié (R) et un radical libre

ascorbyl (RLA). La réaction entre deux molécules du RLA conduit à l'obtention d'une molécule d'acide ascorbique et d'une molécule d'acide déshydroascorbique (ADHA) qui peut être transformé en acide ascorbique par l'ADHA réductase ou en composé stable, l'acide dicétogulonique (Fig. 5) (Rose et Bode, 1993).

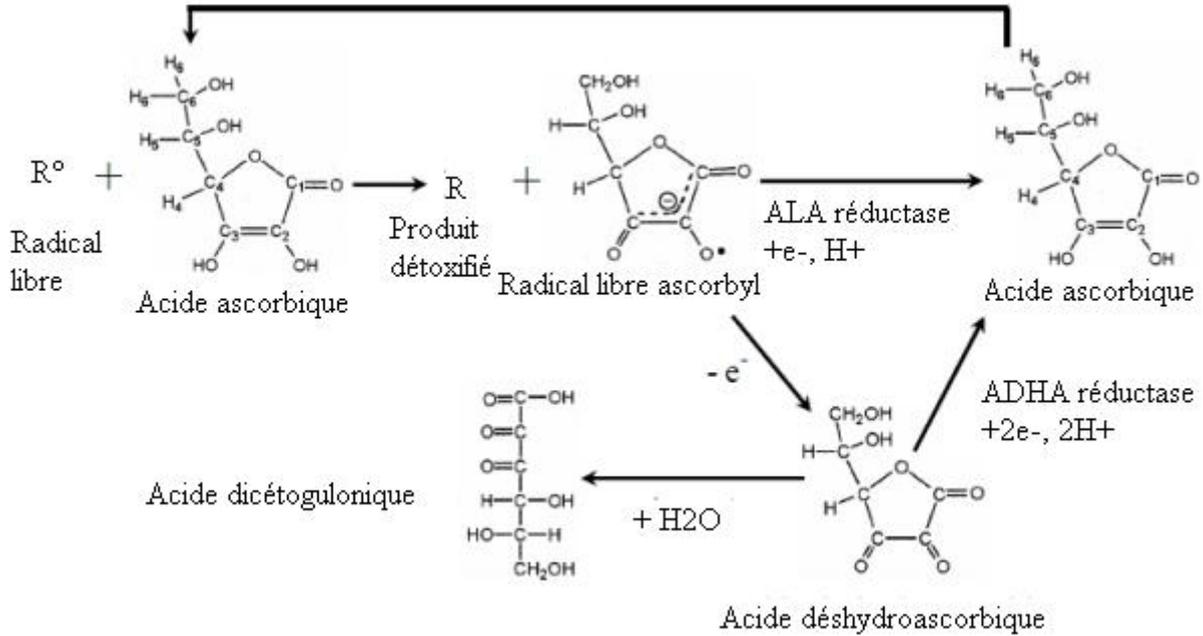


Figure 5. Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération (Rose et Bode, 1993)

b) Régénération des tocophérols

Contrairement aux tocophérols, l'acide ascorbique est soluble en milieu aqueux. Il ne peut donc jouer un rôle qu'à l'extérieur de la membrane cellulaire, en réagissant avec les radicaux libres du milieu aqueux (Rose et Bode, 1993). Par interaction avec un radical R° , le tocophérol se transforme en un radical tocophéryl. Ce dernier est régénéré en tocophérol sous l'action de l'acide ascorbique qui, à son tour, prend une forme radicalaire (radical ascorbyl). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer l'acide ascorbique en se transformant en un radical thyl (GS°) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG) (Fig.6) (Pincemail *et al.*, 1998).

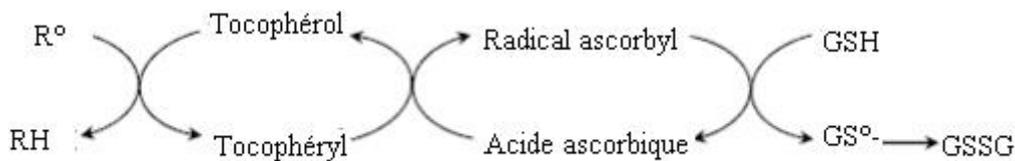


Figure 6. Régénération des tocophérols via l'action de l'acide ascorbique (Pincemail *et al.*, 1998)

5.2 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes, pigments liposolubles, sont responsables des couleurs jaune, rouge et orange des fruits et des légumes. Ces pigments appartiennent à la famille des tétraterpénoïdes (C₄₀) formés de huit unités isoprènes (C₅) liées et forment une molécule symétrique (**Rodriguez-Amaya, 2001**). Ce squelette peut être modifié par:

- Cyclisation à une extrémité ou aux deux extrémités de la molécule pour obtenir des groupes terminaux différents ;
- Les changements dans les niveaux d'hydrogénation ;
- L'apport d'oxygène contenant des groupes fonctionnels (**Dutta et al., 2005**).

5.2.1 Structure

Il existe deux grandes classes de caroténoïdes :

a) Les carotènes

Les carotènes (β -carotène, α -carotène, phytofluène, phytoène, etc.) présentent des chaînes hydrocarbonées avec un grand nombre de liaisons conjuguées, qui leur confèrent une coloration pouvant aller du jaune au rouge (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

b) Les xanthophylles

Elles sont plus polaires que les carotènes et renferment des atomes d'oxygène dans leur structure (lutéine, zéaxanthine, violaxanthine, etc.) (**Rodriguez-Amaya, 2001**).

Les principaux caroténoïdes (85% des caroténoïdes totaux) identifiés dans les raisins sont le β -carotène et la lutéine (Fig. 7), le reste étant néochrome, néoxanthine, violaxanthine, luteoxanthin, flavoxanthin, la zéaxanthine et les isomères -cis de lutéine et de β -carotène. Les caroténoïdes sont directement impliqués dans l'arôme du raisin, en subissant une dégradation qui mène à l'apparition de composés norisoprénoïdes connus pour leurs pouvoirs aromatisants (**Bunea et al., 2012**).

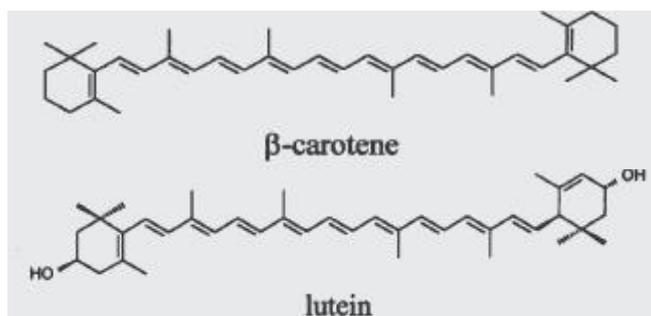


Figure 7. Structure chimique des principaux caroténoïdes des raisins
(Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004)

Le profil et la teneur en caroténoïdes des raisins pourraient être influencés par plusieurs facteurs, tels que:

- *La variété* : des études expérimentales ont montré des différences qualitatives et/ou quantitative entre les variétés d'un même aliment (Rodriguez- Amaya et Kimura, 2004) ; Bunea et al. (2012) ont montré que la teneur en caroténoïdes des raisins varie d'une variété à l'autre en passant de 816 (Aromat de Iași) à 1070 µg/kg (Napoca) ;
- *Le climat et l'origine géographique*: l'élévation de la température et une exposition au soleil peuvent avoir un effet sur la caroténogenèse dans les fruits tels que la tomate. Un climat tropical favorise la biosynthèse des caroténoïdes (Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004) ;
- *Le stade de maturation* : généralement, la maturation des fruits (mango) et légumes (poivre vert) est accompagnée d'une synthèse de caroténoïdes (Rodriguez- Amaya et Kimura, 2004) ;
- *Les différentes méthodes utilisées pour l'extraction de ces composés* : notamment le solvant d'extraction, le temps et le pH (Bucić-Kojić et al.,2011) ;
- *Les conditions de culture*: l'utilisation d'engrais peut aussi influencer la composition en caroténoïdes. La comparaison de la même variété de carotte (Kale) et à un même stade de maturité cultivé dans une ferme conventionnelle utilisant des engrais avec celle non traitée a révélé une augmentation significative de la teneur en caroténoïdes dans les échantillons traités (Rodriguez-Amaya et Kimura, 2004) ;
- *Les caractéristiques du sol* : L'étude d'Oliveira et al. (2003), a montré que la capacité de rétention d'eau des sols affecte la teneur en caroténoïdes des raisins ; cette teneur

est faible lorsque les vignes sont plantées dans un sol ayant une faible capacité de rétention d'eau qu'ils soient irrigués ou non ; et élevée lorsque les vignes sont cultivées dans un sol à capacité de rétention d'eau élevée. Dans ce cas, Il semble possible de produire des raisins avec un poids plus élevé et un taux de sucre élevé avec des teneurs en caroténoïdes similaires dans un sol à capacité de rétention d'eau supérieure et irriguée.

5.2.2 Propriétés antioxydantes

Les propriétés antioxydantes des caroténoïdes sont attribuées à leur capacité de piéger l'oxygène singulet et les radicaux libres.

a) Piégeage de l'oxygène singulet

Le mécanisme principal de la photoprotection des caroténoïdes contre l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est le transfert d'énergie électronique malgré que ces réactions chimiques peuvent aussi conduire à une destruction des caroténoïdes (Dutta *et al.*, 2005).



Le $^3\text{CAR}^{\cdot}$ produit peut revenir à l'état initial en libérant de l'énergie sous forme de chaleur. Dans ce cas, les caroténoïdes agissent comme des catalyseurs désactivant l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Dutta *et al.*, 2005).



b) Piégeage des radicaux libres

Les caroténoïdes peuvent également réagir avec les radicaux libres par l'intervention des mécanismes suivants : (Dutta *et al.*, 2005).

- **Transfert d'électrons** : l'oxydation du radical avec un grand potentiel redox peut libérer un électron à partir d'une molécule de caroténoïde pour donner un radical cation ($\text{CAR}^{\cdot+}$) ;
- **Formation d'adduits** : les caroténoïdes réagissent avec les radicaux libres et donnent des complexes radicalaires stables ;
- **Transfert d'hydrogène** : les caroténoïdes peuvent inhiber les radicaux libres par transfert d'hydrogène formant ainsi un radical CAR^{\cdot}



5.3 Les composés phénoliques

5.3.1 Généralités biochimiques

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques caractérisées par la présence de plusieurs groupements phénols associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes (**Chira *et al.*, 2008**). Le terme polyphénol a été introduit en 1981, en remplacement du terme ancien de tanin végétal, et a été défini comme suit : « Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 30000 dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines ». En plus de cette définition s'ajoute leur pouvoir antioxydant élevé (**Frankel *et al.*, 1998**). Environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'aujourd'hui ; la plupart des composés phénoliques sont formés à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façon variable suivant les végétaux (**Macheix *et al.*, 2005**). La figure 8 représente la voie de biosynthèse des composés phénoliques dans la baie de raisin.

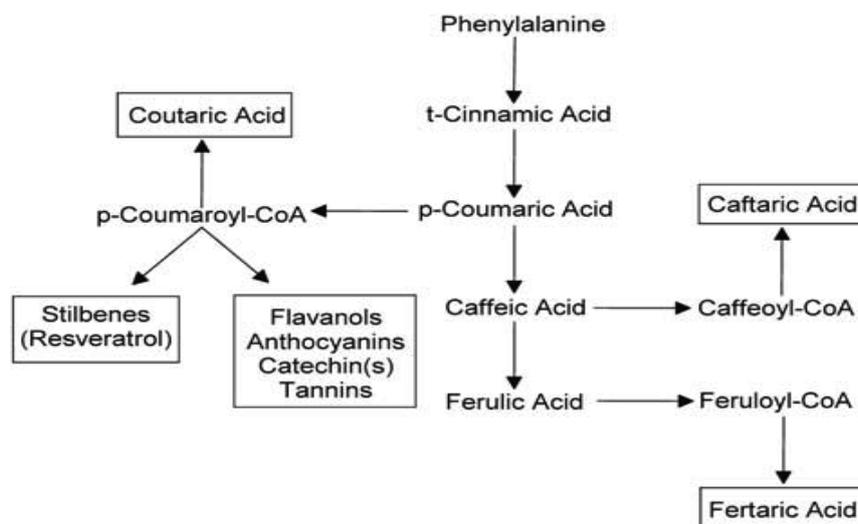


Figure 8. Voie biochimique qui mène aux principales classes de polyphénols solubles présents dans la baie de raisin (**Adams, 2006**).

Les composés qui s'accumulent dans les fruits sont entourés par des rectangles et les intermédiaires (non décrits) sont généralement présents à de très faibles niveaux

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants et toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différant par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (par ex. glycosylées, estérifiées, acylées) (**Cheyrier *et al.*, 1998**). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénols, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 dalton, comme les tanins. Ce sont des molécules contenant au moins un cycle benzénique et des groupes hydroxyles. C'est parce que certains groupes hydroxyles se lient aux protéines salivaires que certains polyphénols comme les tanins sont définis comme astringents en donnant une sensation de sécheresse en bouche (**Chira *et al.*, 2008**).

Leur synthèse dans les tissus est stimulée lorsque la plante est agressée par des parasites ou sujette à des contraintes de l'environnement telles que le rayonnement ultra-violet. Au niveau de la plante, ces métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes de défense en réponse aux attaques pathogènes. À ce titre, ils participent aux mécanismes de défense de la plante, en raison notamment de leurs propriétés antioxydantes. En effet, certains composés amers ou astringents, limitent la palatabilité et la digestibilité de certaines plantes alors que d'autres sont synthétisés de manière accrue avec par exemple des phénomènes de lignification des parois dans le but de limiter la progression des pathogènes. Les tanins par leur complexation avec les polysaccharides pariétaux renforcent la structure des parois cellulaires. Les polyphénols peuvent également, par leur couleur, jouer un rôle dans les mécanismes de pollinisation et de dissémination des graines (**Jourdes, 2003**).

Certains fruits présentent des concentrations très fortes en composés phénoliques, tels que la baie de raisin, la prune ou le kaki. Le raisin contient de grandes quantités de composés phénoliques, dont les catéchines principalement concentrées dans les pépins et les pellicules (**Chira *et al.*, 2008**).

Bien que plusieurs hypothèses aient été formulées, leur rôle physiologique reste assez obscur. Néanmoins, ces composés jouent un rôle essentiel dans les propriétés technologiques, nutritionnelles et organoleptiques des produits de transformation des végétaux destinés à l'alimentation. La littérature fournit de nombreuses données dont la comparaison est difficile car les techniques de quantification sont multiples. De plus, les paramètres agronomiques

(cultivar, degré de maturité, conditions de culture, *etc.*) contribuent à la variabilité des mesures.

5.3.2 Propriétés antioxydantes

Les composés phénoliques du raisin possèdent indéniablement des propriétés thérapeutiques, en particulier pour certaines pathologies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension et certains cancers (tableau I). D'après **Chira et al. (2008)**, parmi les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués dans la prévention de pathologies chroniques, on retient les possibilités suivantes :

- Un effet piège direct sur les radicaux libres ;
- Un effet d'économie d'antioxydants endogènes (vitamine E, vitamine C, β -carotène...);
- Un effet d'économie d'enzymes antioxydantes (SOD : superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) ;
- Un effet de diminution de la cholestérolémie et de « rééquilibrage » des lipides sanguins (HDL/LDL) ;
- Un effet de chélation sur des cofacteurs d'oxydation comme certains métaux (Fe^{2+} , Cu^{2+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant: le fer pour la catalase, le cuivre et le zinc pour la superoxyde dismutase;
- Un effet d'inhibition sur des enzymes oxydatives comme les cyclooxygénases et lipooxygénases ;
- Un effet sur la synthèse du monoxyde d'azote endothélial (facteur de relaxation) : au niveau cellulaire de la paroi artérielle entraînant une vasorelaxation et une hyperpolarisation de la membrane par relargage de potassium extracellulaire ;
- Un effet inhibiteur dans la genèse de production de la NAPH oxydase au niveau des cellules de la paroi vasculaire (aorte thoracique et cœur), d'où une diminution de la production de radicaux libres.

Tableau I: Propriétés biologiques de quelques composés phénoliques dans l'organisme

Polyphénols	Activité biologique	Auteurs
Acides phénol (cinnamiques et benzoïque)	-Antibactérienne, antiulcéreuse, -Antiparasitaire, antifongique, -Antioxydante	-Sannomiya <i>et al.</i> , 2005 ; -Barros <i>et al.</i> , 2007 ; -Gurbuz <i>et al.</i> , 2009.
Coumarines	-Anticancérogène, anti-inflammatoire antiallergique;	-Kostova, 2005 ;
Flavonoïdes	-Antioxydant ; -Réduit l'agrégation plaquettaire ; -Antithrombotique; -Antiulcéreuse	-O'Byrne <i>et al.</i> , 2002; -Keevil <i>et al.</i> , 2000 ; -Freedman <i>et al.</i> , 2001 ; -Sannomiya <i>et al.</i> , 2005.
Anthocyanes	-Antioxydante	-Revilla et Ryan. 2000 ; Cisse <i>et al.</i> , 2009 ;
Proanthocyanidines	-Anti-inflammatoire, antiulcéreuse -Protection contre les maladies cardiovasculaires ;	-Antal <i>et al.</i> ., 2003. - Mink <i>et al.</i> , 2007 ;
Tanins galliques et catéchiques	-Anti cancéreux -Activité antibactérienne vaste	- Veluri <i>et al.</i> , 2006 ; - Doss <i>et al.</i> , 2009.

5.3.3 Rôles et intérêts des composés phénoliques

a) Chez les végétaux

Les composés phénoliques interviennent dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Les composés phénoliques interviennent également lors de la conservation après récolte de certaines végétaux dans les critères de qualité qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (Macheix *et al.*, 2005). L'étude menée par Brzozowska et Hanower (1976) sur des cotonniers montre également que les polyphénols pourraient jouer un rôle dans la résistance à la sécheresse.

b) Chez les humains

Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Macheix *et al.*, 2005**). Plusieurs études ont montré que les polyphénols peuvent protéger la santé humaine contre beaucoup de maladies entre autre les maladies parodontales (**Furiga *et al.*, 2009**). Le raisin est un fruit riche en composés phénoliques ; des travaux sur ses effets bénéfiques spécifiques sont en cours (**Chira *et al.*, 2008**). Les polyphénols pourraient donc jouer un rôle préventif lorsqu'ils sont consommés régulièrement et intégrés à l'alimentation. Néanmoins, les méthodes disponibles pour mesurer les effets de ces composés *in vivo* sont insuffisantes et les données sur les effets à long terme de la consommation des polyphénols sont particulièrement rares.

c) Pour l'industrie

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes sont également utilisés comme colorants pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La pigmentation des anthocyanes dépend de nombreux facteurs : (i) la proportion et les formes d'anthocyanes présentes; (ii) les associations existantes entre les anthocyanes et les autres molécules présentes, (iii) de nombreux facteurs physiques et chimiques tels que le pH, la nature du solvant, la température ainsi que de la présence de sels métalliques (**Cheyrier *et al.*, 2006**). L'effet du pH est le premier facteur agissant sur le changement de couleur d'une anthocyane donnée. La variation de structure de l'anthocyane en fonction du pH est une particularité de ces molécules. Une solution aqueuse d'anthocyane à pH très acide a une forte coloration rouge, coloration qui vire vers le bleue quand le pH augmente vers la neutralité. A pH neutre, l'anthocyane est incolore. Ces changements de couleur sont dus à des équilibres chimiques réversibles entre les différentes formes obtenues à partir de réactions de déprotonation et d'hydratation de l'ion flavylum (**Gomez, 2009**).

d) Dans la régénération des sols pollués

Ce processus était ignoré jusqu'à tout récemment et il consiste en la biotransformation des matières organiques dans le sol où la lignine du type syringyl joue un rôle essentiel, tout comme un grand nombre d'autres composés phénoliques. Cette biotransformation n'est que le début d'un long processus lié à la transformation des sols, ce qui est la régulation de la vie des sols, par un contrôle de la mise en disponibilité des nutriments. Elle influence directement la résistance à l'érosion, stimule, protège à la fois différentes phases de la vie animale, bactérienne, fongique qui sont les principales responsables de la pédogenèse (**Lemieux et**

Germain, 2002). C'est ainsi que le sol demeure stable et fertile. La biotransformation des tissus organiques est responsable du maintien de la biodiversité et de la structure physique du sol. Ces caractéristiques biologiques régissent la disponibilité de l'azote et du phosphore.

5.3.4 Principaux composés phénoliques du raisin

Comme nous l'avons vu, les polyphénols ou les composés phénoliques sont des constituants importants du raisin. Il s'agit des produits du métabolisme secondaire des plantes. D'un point de vue chimique, les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles ; ils peuvent être divisés en deux groupes : (i) les acides phénoliques et les composés associés appelés communément les non-flavonoïdes et (ii) les flavonoïdes (**Shi et al., 2003**).

a) Les composés non-flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes recouvrent les acides phénols, divisés en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques, porteurs d'une chaîne latérale insaturée, mais également d'autres dérivés phénoliques tels que les stilbènes (resvératrol, picéïde) de structure C₆-C₂-C₆. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone », il s'agit des principaux non-flavonoïdes d'importance alimentaire.

a.1) Les acides phénoliques

Les acides phénols majoritaires du raisin sont :

- *Les acides hydroxycinnamiques* : caractérisés par un squelette carboné en C₆-C₃ (Fig. 9). L'acide cinnamique est produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la Phénylalanine Amonia-Lyase (PAL), l'acide *para*-coumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique. L'acide cinnamique et les acides hydroxycinnamiques sont aussi désignés sous le terme de phénylpropanoïdes. Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbone, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique. Ils incluent l'acide *para*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Ils sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation et ils s'accumulent souvent sous forme d'esters d'acide tartrique : acides coutarique, caftarique et fertarique, esters respectifs des acides p-coumarique, férulique et sinapique. Le composé majeur des acides hydroxycinnamiques dans le raisin est l'acide caftarique (ester caféoyl-tartrique).

- *Les acides benzoïques* : ils possèdent un squelette carboné en C₆-C₁, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (Fig. 9). On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Ils existent sous forme libre ou estérifiée par des flavanols. Dans le raisin, l'acide gallique est le plus abondant au niveau des pépins (Chira *et al.*, 2008). La forme naturelle est le trans (E) mais les isomères cis (Z), existent en faible quantité (Cheynier *et al.*, 1998).

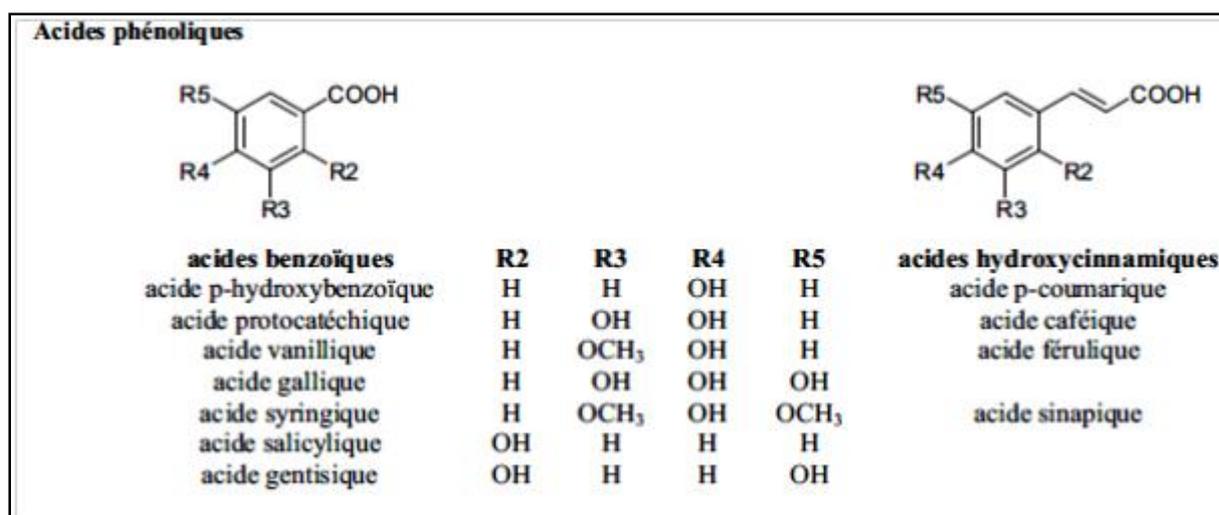
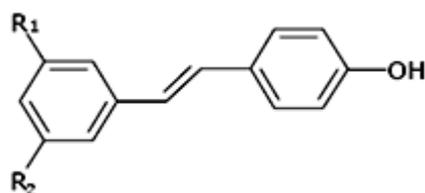


Figure 9. Structure des acides phénoliques du raisin

a.2) Les stilbènes

Les stilbènes (1,2-diaryléthènes) phytoalexines sont des composés polyphénoliques qui ont une structure C₆-C₂-C₆, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène. On parle beaucoup de ce groupe de composés, dont on connaît l'une des molécules, le **resvératrol** (3,5,4'-trihydroxystilbène) (Fig. 10); essentiellement pour ses propriétés antiradicalaire et son implication sur les aspects pharmaceutique et médicinal. Généralement, les stilbènes participent à la résistance des tissus végétaux aux agressions fongiques, en particulier à *Botrytis cinerea*. Le resvératrol est synthétisé par la condensation du 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la stilbène synthase. La lumière UV avec de courte longueur d'onde (254 nm) peut également induire la formation du resvératrol dans des feuilles de la vigne ou les baies de raisin (Jeandet *et al.*, 1995). Les stilbènes se présentent en quantités beaucoup moins faibles que les flavonoles (Adams, 2006).

Le resvératrol se trouve sous forme *cis* et *trans*, et est présent dans les tissus végétaux principalement sous forme de trans-resvératrol-3-O-glucosides (trans-picéide et transastringine) (Chira *et al.*, 2008).



Stilbènes	R1	R2
Pterostilbène	OCH ₃	OCH ₃
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGlu	OH

Figure 10. Structures chimiques de quelques stilbènes.

D'après Jeandet *et al.* (1995), les stilbènes, qui sont formés suivant la voie de la phénylalanine / polymalonate, s'accumulent très rapidement dans les tissus de raisin sains adjacents aux zones infectées par *Botrytis cinerea*. Cependant, certains résultats indiquent que, dans les vignes, les changements dans le potentiel de production phytoalexine dépendent du stade physiologique de la plante; la capacité des cellules de la peau de raisins *Vitis vinifera* (var. Pinot noir) pour synthétiser le resvératrol diminue brusquement à la véraison (la brève période correspondant au début de l'accumulation des anthocyanes dans les peaux de raisins rouges), c'est qui est démontré également par les travaux de Moriartry *et al.* (2001).

b) Les composés flavonoïdes

Les flavonoïdes, la classe de polyphénols la plus importante, forment une grande famille de composés phénoliques ayant une structure commune en C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane, comportant deux cycles benzéniques reliés par un oxygène contenant un cycle pyrène (Fig. 11). Certains d'entre eux affichent des couleurs très vives des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les retrouve dans les vacuoles des cellules des plantes, ils se divisent en plusieurs sous familles se distinguant par le degré d'oxydation et la substitution en position 3 et 4 du cycle pyranique C. Il existe environ une douzaine de classes reconnues de flavonoïdes dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. On notera que les isoflavones ne sont pas présentes dans le raisin. Les anthocyanes, les flavonols et les flavan-3-ols sont les principaux flavonoïdes présents dans les baies de raisin de type *Vitis vinifera*.

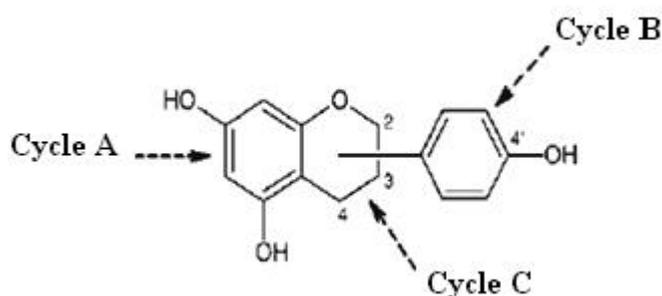
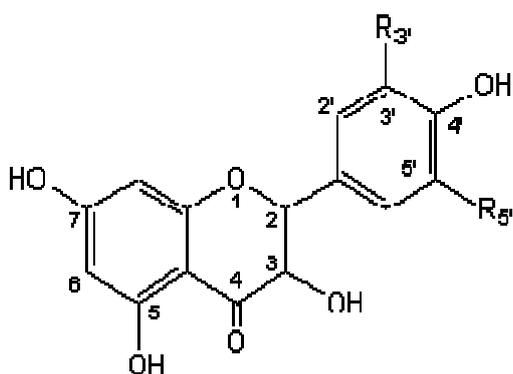


Figure 11. Squelette de base des flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008)

L'activité antioxydante des flavonoïdes a déjà été montrée il y a environ 40 ans. Leur activité antioxydante dépend de la réactivité des substituants d'hydroxyle dans les réactions de transfert d'atome d'hydrogène (Denisov et Afanas'ev, 2005).

b.1) Les flavonols

Dans la baie de raisin, les flavonols, pigments de couleur jaune pâle, sont des produits de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, qui donnent également lieu à des anthocyanes et des tanins condensés ; ils sont présents uniquement au sein de la pellicule. Ils existent sous forme de glycosides en position 3, généralement glucosylés mais on trouve également des quantités importantes de glucuronides. Quatre flavonols glycosylés dérivés de quatre aglycones sont majoritairement présents dans le raisin (le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine) (Fig. 12). Des dérivés de syringétine et de laricitrine ont récemment été mis en évidence dans les variétés rouges (Mattivi *et al.*, 2006).



Flavonols	R3'	R5'
Kaempférol	H	H
Quercétine*	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamnétine	OCH ₃	H
syringétine	OCH ₃	OCH ₃
laricitrine	OH	OCH ₃

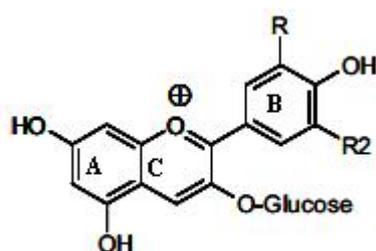
* La quercétine (hétéroside) représente 80% des flavonols totaux.

Figure 12. Structure aglycone des flavonols du raisin

b.2) Les anthocyanes

✘ *Présentation*

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kyanos* = bleu), sont des pigments hydrosolubles qui colorent les pétales, les téguments des graines, les fruits et les feuilles dans des nuances variées de rouge, violet et noire. Ce sont des composants ubiquitaires des aliments et boissons auxquels ils communiquent leur couleur. Grâce à leurs propriétés tinctoriales et leur innocuité, les anthocyanes ont été admis comme colorants alimentaires (E163) (Antal *et al.*, 2003). Les anthocyanes s'accumulent dans la pellicule de la baie au niveau des vacuoles des cellules hypodermiques des raisins noirs (les raisins blancs en sont dépourvus). Ces composés sont impliqués dans la protection des plantes (absorbance dans le domaine des UV). Les anthocyanes du genre *Vitis vinifera* sont la cyanidine-3-*O*-glucoside, la delphinidine-3-*O*-glucoside, la paeonidine-3-*O*-glucoside, la pétunidine-3-*O*-glucoside et la malvidine-3-*O*-glucoside (Fig. 13) qui est toujours majoritaire bien que la composition relative des anthocyanes varie selon les cépages (Revilla *et al.*, 2001).



Anthocyane	R	R2
Cyanidine-3- <i>O</i> -glucoside	OH	H
Delphinidine-3- <i>O</i> -glucoside	OH	OH
Paeonidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	H
Pétunidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	OH
Malvidine-3- <i>O</i> -glucoside	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidine-3- <i>O</i> -glucoside	H	H

Figure 13. Structure des principales anthocyanes du raisin

✘ *Equilibre des anthocyanes en fonction du pH*

La couleur des anthocyanes dépend de leur structure chimique mais également du milieu physico-chimique dans lequel elles se trouvent. Parmi les principaux facteurs de ce milieu influençant la couleur, on peut citer le pH, en fonction duquel quatre formes régies par un équilibre coexistent en milieu aqueux, qui se manifestent par des spectres d'absorbance différents (Fig.14).

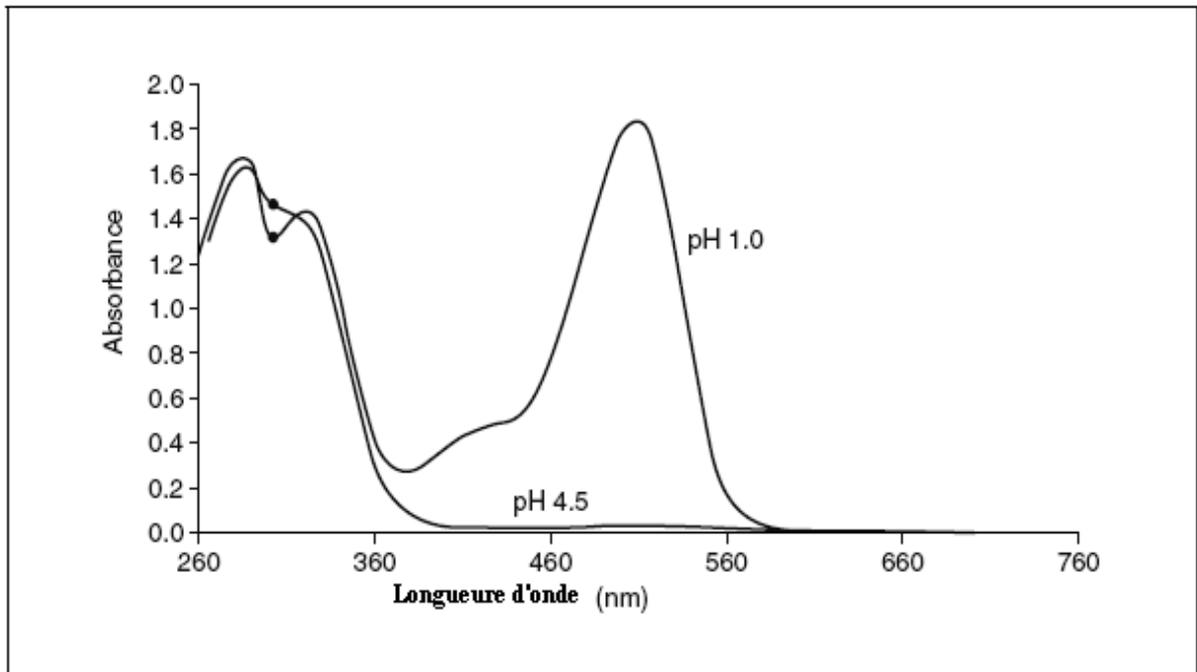


Figure 14. Spectre d'absorbance des anthocyanes rouges purifiées dans des solutions tampons pH 1.0 et pH 4.5 (Giusti et Wrolstad, 2001)

Dans un milieu acide (pH 1-3), la couleur des anthocyanes est déterminée par le degré d'hydroxylation du cycle B, produisant un effet bathochromique (la couleur devient plus sombre), alors que la méthylation sur les positions 3' et 5' (R, R2) donne un effet hypsochromique (la couleur devient plus claire) (Antal *et al.*, 2003).

Quatre formes des anthocyanes coexistent selon le pH du milieu (Fig. 15) :

- Le cation flavylum A⁺ de couleur rouge ;
- Les bases quinoniques AO de couleur bleu-mauve ;
- Les pseudobases ou bases carbinols AOH sont incolore ;
- Les chalcones C *cis* et *trans*, de couleur jaune clair.

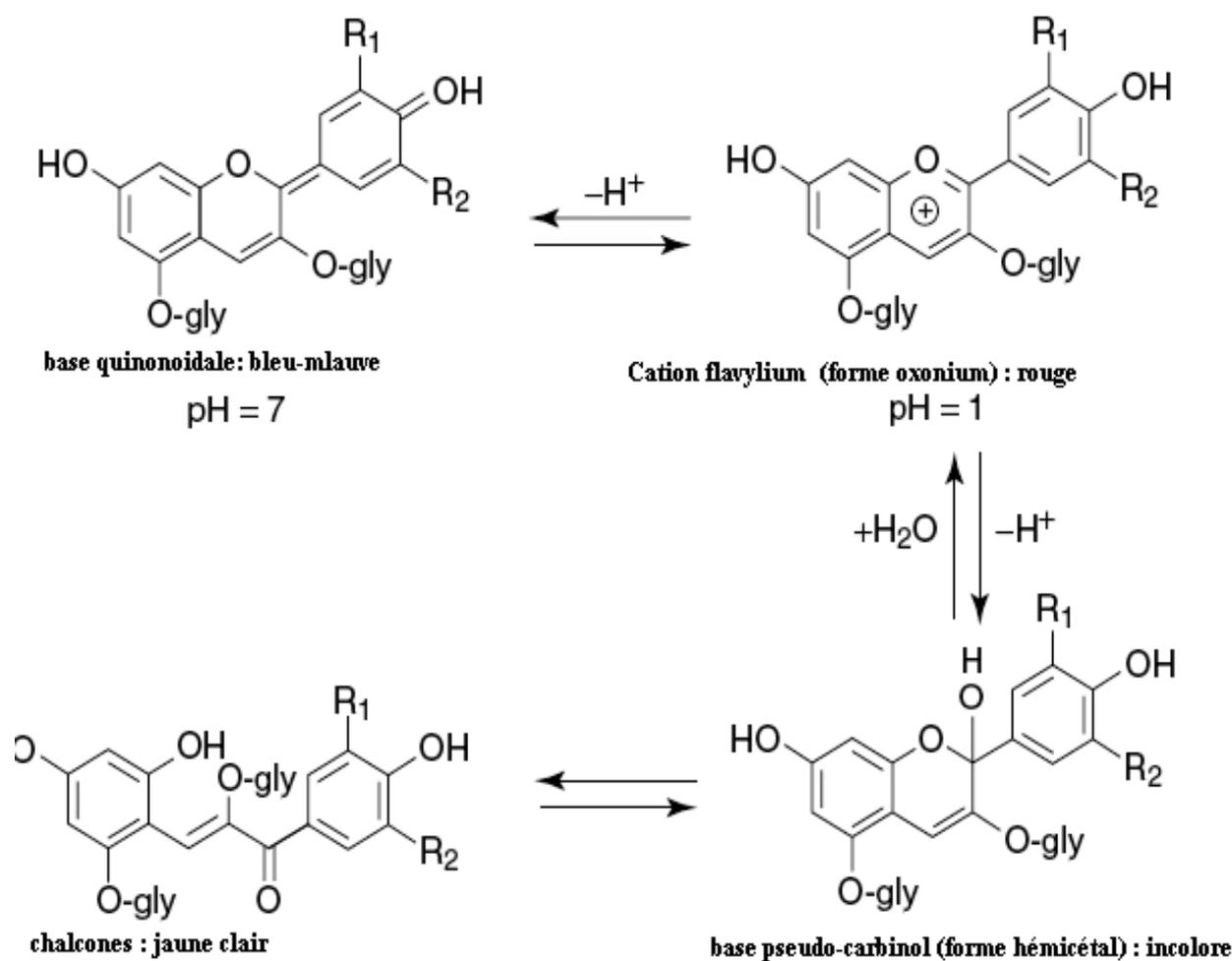


Figure 15. Formes structurales des anthocyanes prédominantes à différents pH (Giusti et Wrolstad, 2001)

Entre pH 3.0 et 4.0, les formes prédominantes des anthocyanes sont les formes incolores AOH, elles représentent entre 65 et 85 % de la totalité des anthocyanes. La forme flavylium A⁺ rouge représente sur ce même intervalle de pH entre 4 et 28 % des anthocyanes. Les formes AO représentent également une part importante de l'intensité colorante globale, puisqu'elles représentent entre 2 et 5 % des anthocyanes totales. A pH 4, elles représentent le chromophore majoritaire, les formes chalcones étant faiblement colorées (Fig. 16) (Jourdes, 2003).

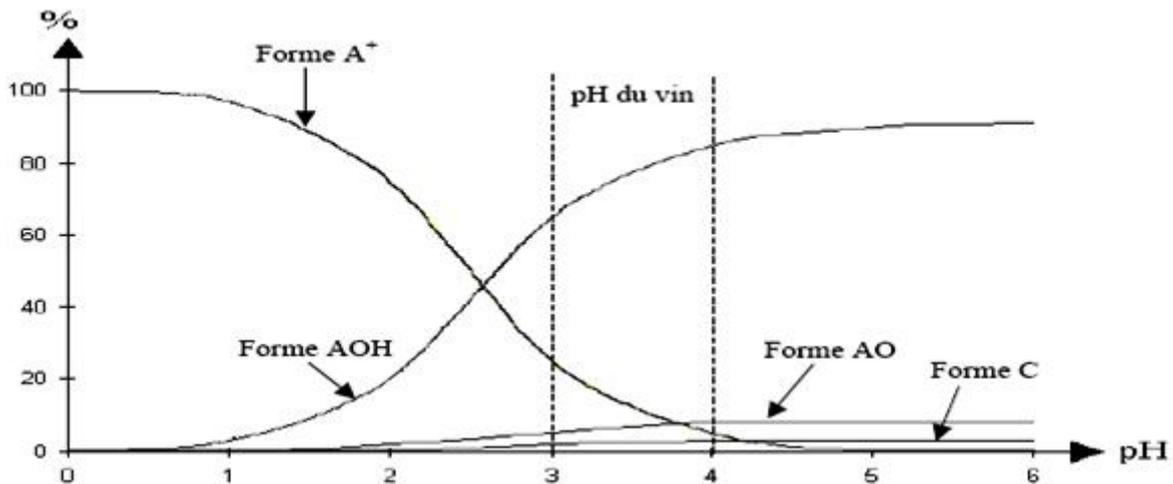


Figure 16. Évolution de la proportion des différentes formes des anthocyanes extraites des pellicules du Cabernet sauvignon en fonction du pH (Jourdes, 2003)

Le rôle de la couleur peut s'avérer significatif comme c'est le cas chez certaines fleurs dont la couleur bleue due à la delphinidine est un des atouts privilégiés pour attirer les abeilles pollinisatrices.

b.3) Les tanins condensés ou proanthocyanidines (flavan-3-ols)

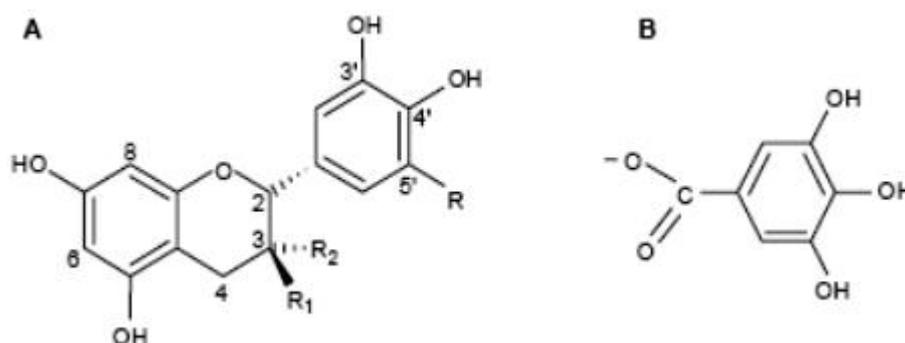
Les tanins condensés appelés aussi proanthocyanidines, sont des polymères de flavanols. Ils sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Dans le raisin, les flavanols se présentent soit sous formes de monomères, soit sous forme de polymères formant alors les tanins condensés dans les couches hypodermiques de la peau et le parenchyme mou des pépins entre la cuticule et le tégument dur (Vivas *et al.*, 2003 ; Adams, 2006 ; Cadot *et al.*, 2006).

Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration de tanins (Kennedy *et al.*, 2000a ; Kennedy *et al.*, 2001). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs carbones asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés (Souquet *et al.*, 1996). Les tanins du pépin sont des procyanidines, partiellement galloylés, basés sur des unités catéchine, épicatechine et 3-O-gallate d'épicatéchine, liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Les tanins de pellicule comprennent aussi des prodelfinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à ceux des tanins de pépins (Cheynier *et al.*, 1998). Les degrés de polymérisations moyens sont de l'ordre de 10 dans les pépins et de 30 dans les pellicules. La concentration des tanins est plus élevée dans les pépins que dans les pellicules, mais pour les vins, la

contribution des pellicules à l'ensemble des tanins de la baie excède parfois celle des pépins (Cheynier *et al.*, 1998). L'étude menée par Nunez *et al.* (2006) montre que la distribution des flavan-3-ols est généralement déterminée par des facteurs génétiques et est également influencée par les conditions climatiques.

✘ Les unités monomériques

Les formes monomériques des flavanols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3, la présence de substituants galloyles, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Fig. 17). On distingue ainsi les formes dihydroxylées (famille des catéchines) des formes trihydroxylées (famille des gallocatéchines). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules et la pulpe de *Vitis vinifera*, suggère leur existence en tant que monomères (Souquet *et al.*, 1996 ; Adams, 2006).



Flavanols (A)	R	R1	R2
(+)-catéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine	H	H	OH
(-)-épigallocatéchine	OH	OH	H
(-)-épicatéchine-3-gallate	OH	H	Acide gallique (B)

Figure 17. Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés. (Maury *et al.*., 2003)

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier l'épicatéchine, formant l'épicatéchine-3-Ogallate (Fig. 18) (Cheynier *et al.*, 1998).

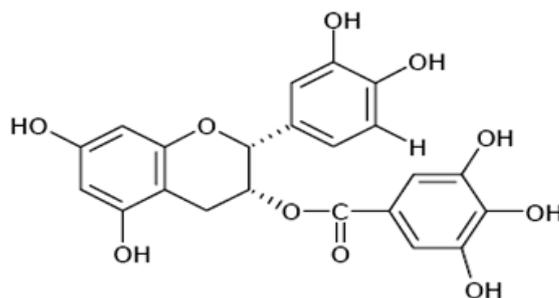


Figure 18. Structure de l'épicatéchine-3-*O*-gallate.

✖ Les tanins condensés (type A et B)

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (réaction de Bate-Smith) (Cheynier *et al.*, 2006). Dans le raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyane libérée. Les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), et les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), qui libèrent par hydrolyse la cyanidine et la delphinidine respectivement (Fig. 19 ; Sun et Spranger, 2005).

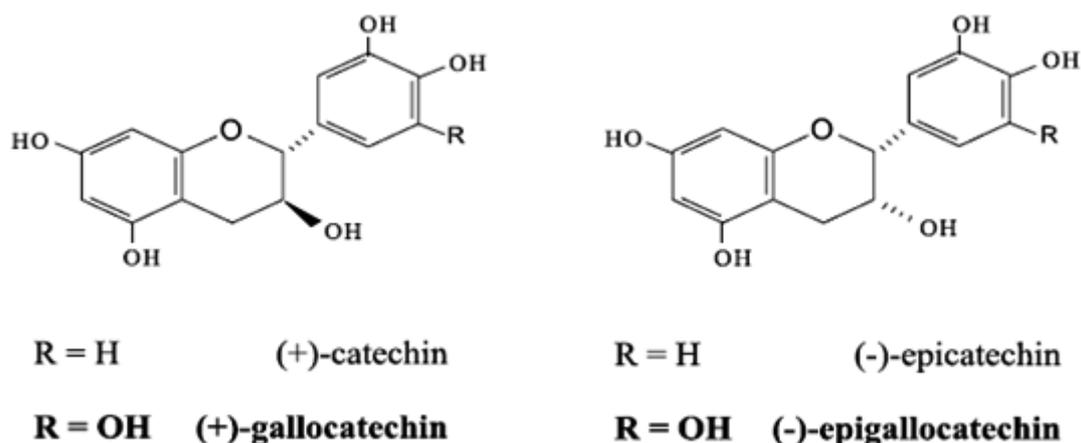


Figure 19. Unités monomériques des proanthocyanidines

La structure des procyanidines dépend non seulement des unités de flavan-3-ols mais également du degré de polymérisation et de la position de la liaison entre ces unités. Selon la position de la liaison, on distingue les proanthocyanidines de type A et de type B. Le type B se caractérise par une liaison qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire C2-O-C ou C-O-C5 du noyau A. la figure suivante en donne un exemple de chaque type (Fig. 20; Sun et Spranger, 2005).

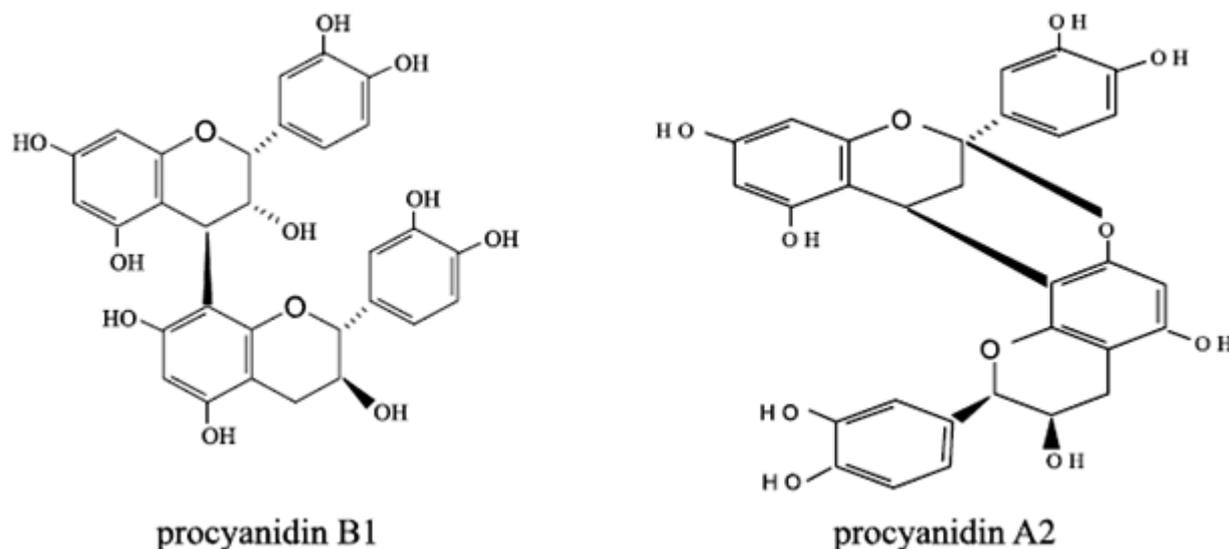


Figure 20. Exemples de proanthocyanidines de type B et A des raisins

Les proanthocyanidines ou les flavan-3-ols présents dans le raisin se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères (60-80%), suivie par les formes oligomériques (15-30%), alors que les monomères flavan-3-ols (catéchines) se présentent en une proportion plus faible (moins de 10 %) (**Sun et al., 2001**). Les tanins de pépins sont constitués essentiellement de procyanidines partiellement galloylées (**Adams, 2006**), alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelphinidines. Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation (DPM), peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins et avoisine les 83 unités dans un extrait de pellicule (**Souquet et al., 1996 ; Kennedy et al., 2001 ; Cheynier et al., 2006**). La figure 21 illustre la structure générale des proanthocyanidines.

D'après **Kennedy et al. (2001) ; Adams (2006) et Cadot et al. (2006)**, les tanins de la pellicule, synthétisés très tôt dans le développement de la baie, changent très peu de la véraison à la récolte, bien que leur concentration diminue le long de la croissance des baies. Les changements qualitatifs, tels que l'augmentation du degré de polymérisation, peuvent également avoir lieu à partir de la véraison à la récolte. Généralement, il ya une baisse de tanins des pépins pendant la maturation qui accompagne le brunissement des pépins, qui peut être due à l'oxydation des tanins.

Les travaux de **Sun et al. (2001)** et ceux de **Ó-Marques et al. (2005)** sur les raisins, montrent que les niveaux des catéchines et des proanthocyanidines varient considérablement, suivant la variété, l'année de récolte et le degré de maturation.

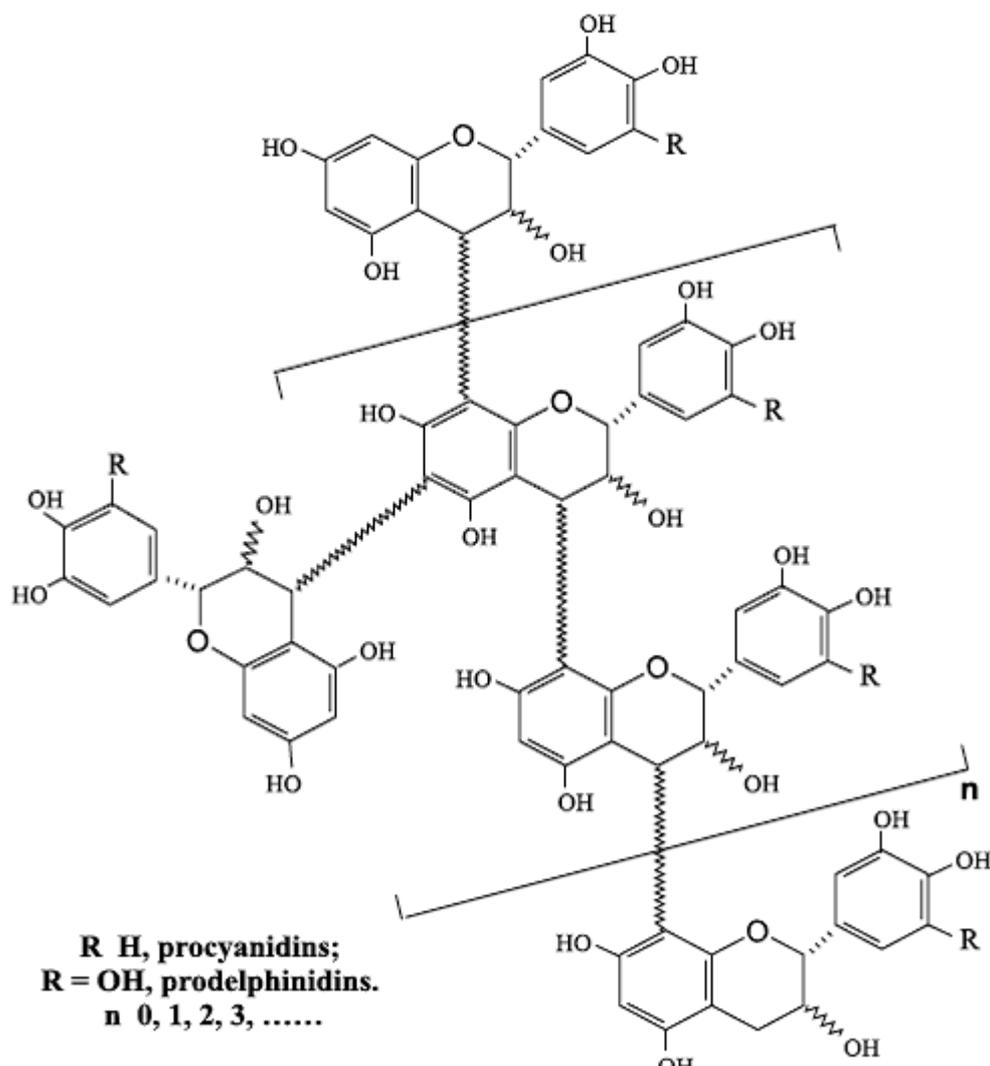


Figure 21. Structure générale des proanthocyanidines

b.4) Localisation et compartimentation des flavonoïdes dans la baie de raisin

Dans le raisin, les différents flavonoïdes ont une localisation spatio-temporelle différente. Les flavan 3-ols sont accumulés principalement dans le péricarpe et la pellicule (Kennedy *et al.*, 2001), et en très faible quantité dans la pulpe (Verries *et al.*, 2008). Les flavonols sont uniquement présents dans la pellicule (Boss *et al.*, 1996; Downey *et al.*, 2003). Quant aux anthocyanes, elles sont localisées exclusivement dans la pellicule des cépages rouges. Dans le cas des cépages dits "teinturiers", on observe aussi une accumulation d'anthocyanes dans la pulpe. Les flavan 3-ols sont synthétisés dans la pellicule pendant la phase herbacée et dans les péricarpes leur accumulation se poursuit jusqu'à environ une semaine après véraison (Kennedy *et al.*, 2001). Les flavonols sont accumulés en deux temps : une première phase de synthèse juste après floraison et une deuxième période de synthèse qui démarre à la véraison et se poursuit pendant toute la maturation (Downey *et al.*, 2003). L'accumulation des anthocyanes ne

démarre qu'à partir de la véraison et se poursuit jusqu'à la maturité (Boss *et al.*, 1996). Cette accumulation est concomitante à celle des sucres dans la pulpe (Fournand *et al.*, 2006).

La figure suivante illustre la voie de biosynthèse des principaux flavonoïdes présents dans les baies de raisin

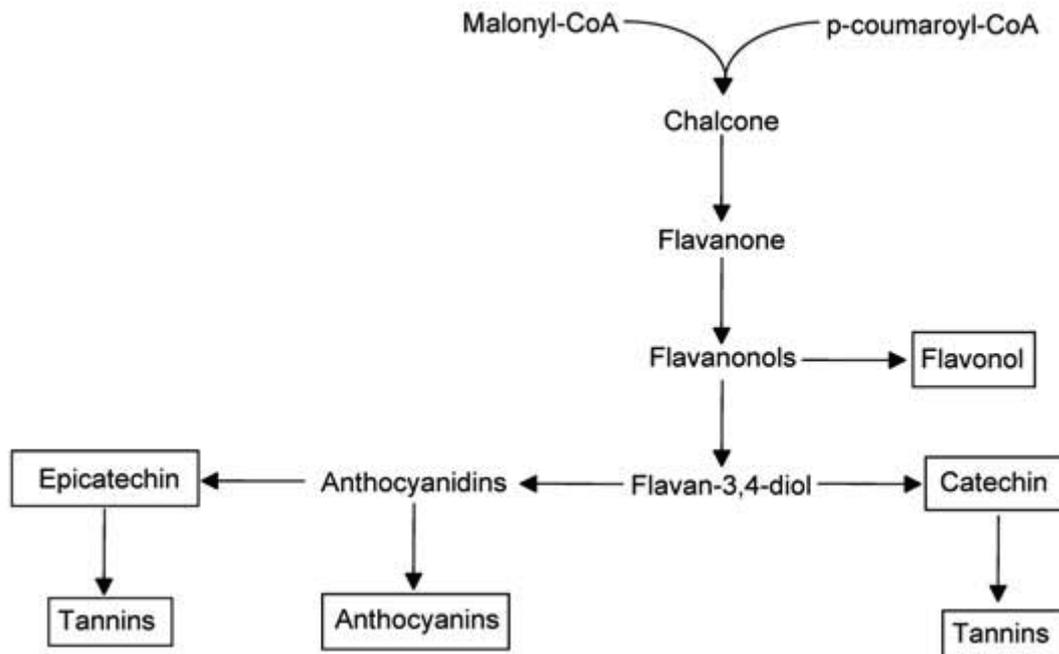


Figure 22. Voie de biosynthèse des principaux flavonoïdes présents dans les baies de raisin (Adams, 2006).

Les composés accumulés dans le fruit sont encadrés dans des rectangles, les autres intermédiaires sont présents à de faibles niveaux

6. Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont particulièrement sensibles aux changements des conditions du milieu mais ils restent sous la dépendance de facteurs génétiques. Ils dérivent d'une voie du métabolisme des sucres donc les facteurs qui agissent sur la teneur en sucres agissent sur la teneur en composés phénoliques

6.1 Le climat

Comme nous l'avons vu précédemment, les composés phénoliques interviennent dans de nombreux mécanismes permettant à la plante de s'adapter à son milieu. Plusieurs paramètres jouent un rôle important pour la détermination de la composition du raisin. Dans ce contexte nous pouvons citer le climat comme étant le premier facteur et en particulier pour la viticulture (Cadot *et al.*, 2001). Il influence le cycle de développement de la vigne notamment pendant la maturation des raisins, la récolte pouvant être de bonne ou de mauvaise qualité

selon le climat. Les facteurs caractérisant le climat sont la température, les précipitations et l'ensoleillement. La qualité d'un millésime est étroitement liée aux conditions climatiques. Les conditions climatiques souhaitables sont un ensoleillement intense, des températures plus basses pendant la nuit et plus élevées le jour, qui favorisent l'accumulation des précurseurs d'arômes et des anthocyanes, des pluies faibles à absentes aux alentours des vendanges, permettant un bon état sanitaire des raisins, limitant ou évitant le développement du champignon *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise (**Darrieumerlou et al., 2001**).

a) Lumière

La lumière agit de façon quantitative et qualitative et est corrélée à une augmentation des teneurs en composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes dans les tissus (**Macheix et al., 2005**), ce qui est prouvé dans l'étude menée par **Berli et al. (2008)** sur la variété Malbec de la Mendoza (Argentine) cultivée à différentes altitudes, le cépage exposé aux rayons solaire (UV-B) et cultivé en haute altitude (1500 m) présente des teneurs plus élevées en polyphénols, anthocyanes, resvératrol, et (+)-catéchine. Ceci est expliqué par le fait que les rayons UV-B stimulent l'expression de certains gènes impliqués dans les réponses protectives à haute altitude. **Moriarty et al. (2001)** ont montré, dans leur travaux sur deux variétés californiennes de raisins de table (Black corinth et Flame seedless) que la concentration de resvératrol dans les raisins irradiés avec les rayons UV (lampe 254 nm, pendant 10 min à une distance de 15 cm des échantillons) paraît plus élevée par rapport aux échantillons de mêmes variétés non irradiés. Cependant, De faibles doses (≤ 200 Gy) d'irradiation sont recommandées pour améliorer la teneur en composés phénoliques (par exemple les flavanones, le β -carotène, le lycopène et l'acide ascorbique) dans le pamplemousse en début de saison, tandis que des doses plus élevés (400 – 700 Gy) ont montré des effets néfastes. Aucun effet n'a été observé en fin de saison (**Schreiner et Huyskens-Keil, 2006**). Les travaux de **Dokoozlian et Kliewer (1996)** sur les baies de Cabernet sauvignon et Pinot noir cultivées sans lumière pendant les phases I et II, ou la phase III, étaient plus riches en anthocyanes et en composés phénoliques que les fruits cultivés sans lumière lors des phases I, II, et III. La lumière n'a eu aucun effet sur la concentration en acide tartrique et le pH du jus, mais son grand impact était sur le développement des fruits pendant les étapes initiales de la croissance des baies. La croissance des baies a été réduite et la maturation a été retardée lorsque les fruits ont été cultivés sans lumière pendant les phases I et II. Le développement du fruit normal n'a pas été entièrement restauré lorsque ces fruits ont été exposés à la lumière au cours de la phase III de leur cycle. En outre, d'après les travaux de

Matus et al. (2009), l'ombrage des grappes du Cabernet sauvignon a entraîné une réduction significative de la synthèse de flavonols. Un rayonnement UV a également eu un effet positif sur l'accumulation des flavonoïdes (**Spayd et al., 2002**). De plus, l'exposition au soleil a augmenté spécifiquement la quantité de quercétine-3-O-glucoside dans le Merlot, tandis que le kaempférol-3-O glucoside est restée inchangée (**Tarrara et al., 2008**). Ces résultats montrent que la lumière est le facteur le plus important pour déterminer les niveaux de flavonols dans les baies de raisin.

b) Température

La température peut modifier les teneurs en polyphénols chez les fruits pendant la phase de croissance des fruits sur la plante, mais également après la récolte. En effet, un stress thermique provoqué par des températures froides (4°C) ou élevées entraîne une augmentation des activités des Phénylalanine Amonia Lyase (PAL) et Chalcone Synthase (CHS) qui a pour conséquence d'augmenter les teneurs en composés phénoliques (**Leyva et al., 1995**). En outre, l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases (PPO) et peroxydases (POD) est inhibée, ce qui maximise l'accumulation des polyphénols (**Rivero et al., 2001**). Certaines recherches ont déterminé que des températures modérées et l'exposition au soleil (y compris visible et UV) favorisent l'accumulation des anthocyanes (**Tarara et al., 2008; Matus et al., 2009**) tandis que **Cohen et al. (2012)** ont montré que le chauffage et le refroidissement des baies modifiaient l'accumulation des proanthocyanidines, qui étaient fortement corrélée avec l'expression des gènes de base de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Le chauffage et le refroidissement modifié le taux de croissance et de coloration des baies, et l'expression de plusieurs gènes de structure au sein de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Bien que les proanthocyanidines et les anthocyanes résultent de la même voie de biosynthèse des flavonoïdes, il y a des différences inhérentes à leur régulation et leur réactivité chimique (**Czemmel et al., 2009**). Des températures fraîches nocturnes pendant la période de maturation ont un effet positif sur le contenu en polyphénols totaux de la pellicule de la baie. Cet effet est mesuré par la température minimale moyenne de l'air de la période allant de la véraison à 20 jours avant la récolte. **Tonietto et Carbonneau (2002)** ont indiqué que la fraîcheur des nuits en période de maturation est un bon indicateur des caractéristiques liées à la couleur. Les valeurs voisines de 16 °C pour les températures nocturnes sont favorables à l'accumulation des anthocyanes dans la pellicule, surtout si elles sont associées à des températures diurnes relativement élevées mais sans excès. **Keller et al., (2005)** dans des conditions de climat aride, rapportent que lors de millésimes chauds, notés en Degrés Jours,

combinés à la disponibilité hydrique des sols, l'accumulation des anthocyanes en Cabernet sauvignon s'arrête deux semaines après la véraison tandis que les sucres continuent à augmenter.

6.2 Le sol

Le sol est le deuxième facteur essentiel, dont la constitution modifie la nutrition minérale de la vigne, surtout azotée, et va jouer sur la vigueur des plantes. Un autre constituant des sols d'extrême importance est l'eau, déterminant l'alimentation hydrique du vignoble. Ces deux éléments, l'eau et l'azote, seront décisifs et déterminants pour la qualité finale des raisins. Il a été montré depuis longtemps que le comportement de la vigne et la constitution du raisin dépendent de la nature du sol (**Deloire *et al.*, 2005 ; Bodin et Morlat, 2006 ; Morlat Bodin, 2006 ; Génard *et al.*, 2010 ; Ubalde *et al.*, 2010 .**).

a) Alimentation hydrique de la vigne

La contrainte hydrique réduit la photosynthèse, favorise l'arrêt de croissance, limite la taille des baies et stimule la synthèse des composés phénoliques. Une contrainte hydrique modérée augmente la vitesse de maturation malgré la limitation de la photosynthèse, à cause d'une moindre compétition pour le carbone (arrêt de croissance) et d'un volume plus faible de raisin à remplir. Elle est ainsi un facteur important de précocité (**Van Leeuwen et Vivin, 2008**). Les travaux de **Attia (2007)** sur les cépages Cot, Négrette, Tannat et Duras de la région de Midi-Pyrénées (France), montrent que le stress hydrique stimule la biosynthèse des anthocyanes dès le début de la véraison, puis celles-ci s'accumulent jusqu'à maturité. A maturité, il existe des différences significatives entre les cépages au niveau des concentrations en anthocyanes et que les différents cépages ont un comportement spécifique quant à leur réponse au stress hydrique concernant leur teneur en tanins (exprimés en équivalents de catéchine/baie). Pour chaque cépage, l'effet du stress hydrique est plus important sur les variations de la teneur en tanins que celles des anthocyanes pendant la période de maturité.

Lorsque les racines se trouvent dans un sol en cours d'assèchement, leurs extrémités produisent de l'acide abscissique. Cette hormone est favorable à la maturation du raisin. Une limitation de l'alimentation en eau de la vigne induit des effets négatifs sur la maturation du raisin (limitation de la photosynthèse) et des effets positifs (production de l'acide abscissique, limitation de la compétition pour les substances carbonées par les apex en croissance, baies moins volumineuses). En cas de déficit hydrique modéré, les effets positifs l'emportent sur les effets négatifs : les raisins sont plus riches en sucres réducteurs, en anthocyanes et en tanins et

moins riches en acide malique (**Tregoat et al., 2002 ; Van Leeuwen et Seguin, 2006**). En cas de stress hydrique sévère, la photosynthèse se trouve trop fortement limitée et des blocages de la maturation peuvent se produire.

L'effet d'un déficit hydrique diffère en fonction du stade d'apparition : un stress précoce et jusqu'à la véraison diminue le rendement mais, si la contrainte intervient pendant la maturation elle n'a pas d'effet sur le poids de récolte (**Carbonneau, 2004**). En général, on admet qu'un stress hydrique progressif et modéré favorise l'accumulation en sucres, anthocyanes, composés phénoliques et diminue l'acidité (**Choné et al., 2001 ; Deloire et al., 2003 ; Deloire et al., 2005**).

Deloire et al. (2003), dans une analyse des relations entre le potentiel hydrique foliaire de base, la croissance végétative, le développement des baies et la biochimie du raisin, établissent que la croissance végétative est ralentie à partir d'une valeur du potentiel de base de -0.4 Mpa et que cette croissance est maîtrisée si cette valeur est maintenue au cours de la période véraison-maturité. Il y a donc à la fois une réduction du volume des baies et une stimulation de la biosynthèse des anthocyanes. Ce type de réponse, associé à la taille des baies, est indiqué par d'autres auteurs (**Barbeau et al., 2005**). Par contre, **Ferrer et al. (2003)** ne trouvent pas de corrélation entre la taille des baies et les concentrations en polyphénols totaux, anthocyanes totales et flavonoïdes.

Au delà de son action sur la taille des baies, **Roby et al. (2004)** montrent que le stress hydrique influe sur la concentration en anthocyanes et polyphénols. Le déficit hydrique stimulerait directement la biosynthèse des polyphénols. **Bucchetti et al. (2011)** arrivent au même résultat.

b) Nutrition azotée de la vigne

Parmi les éléments minéraux que la vigne prélève dans le sol, l'azote, qui affecte le plus fortement son développement et la constitution du raisin. Même en l'absence de fertilisation azotée, l'alimentation en azote de la vigne varie en fonction de différents paramètres liés au type de sol : teneur en matière organique, rapport C/N de la matière organique, pH, aération, teneur en calcaire actif et humidité (**Tregoat et al., 2002**).

Plusieurs auteurs ont montré les effets négatifs d'une nutrition excessive en azote sur la composition de baies de raisins, avec une baisse des sucres et des composés phénoliques (**Choné et al., 2001 ; Tregoat et al., 2002**). L'étude de **Choné et al. (2001)** sur les raisins

Cabernet sauvignon de Bordeaux (France) a démontré qu'un sol déficient en azote donne des baies de raisin de petite taille mais riche en composés phénoliques (tanins et anthocyanes). Une autre étude menée par **Génard et al. (2010)** sur les fruits collectés sur les tomates cultivées à faible niveau d'azote a montré que les fruits ont tendance à être plus riches en polyphénols, alors que la concentration en caroténoïdes n'est pas affectée par l'azote, ce qui était également démontré par **Benard et al. (2009)** dans ses travaux sur quelques variétés de tomates.

Chapitre II.
Matériel & Méthodes

CHAPITRE II. MATERIEL & METHODES

1. Origine des échantillons étudiés

Dans notre étude, 6 échantillons de raisin ont été sélectionnés afin de déterminer la composition des baies issues de 5 variétés (récolte 2012). L'étude est menée sur quatre parcelles localisées dans la région d'El-Tarf (Fig. 23).

Les baies de raisins "Cardinal", " Gros noir", " Muscat blanc", "Muscat noir" et "Victoria" ont été récoltées à maturité d'après les propriétaires des différentes parcelles, ce qui a été confirmé, par la suite, par la mesure du taux de sucre, qui varie entre 16,5 à 18,5 °Brix pour les raisins de tables (Yi *et al.*, 1997).

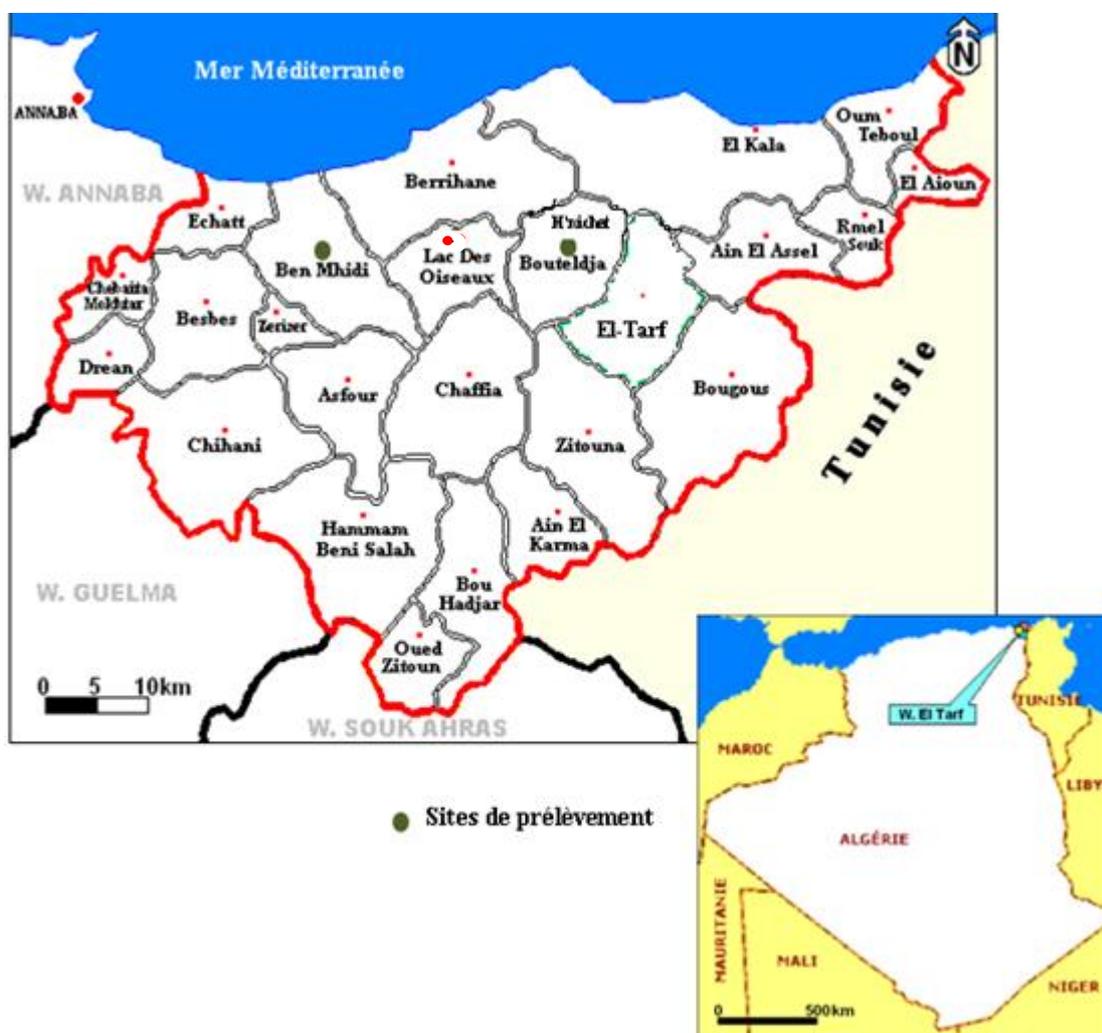


Figure 23. Localisation des sites d'échantillonnage

2. Parcelles échantillonnées

2.1 Parcelle 1

Cette parcelle est située au niveau de la région H'nichet (El-Tarf), elle a été implantée depuis 1980, constitué de plusieurs variétés greffées sur le porte-greffe "SO4" avec une densité de plantation de 2500 à 3000 pieds/ha. Les plantes, âgées de 32 ans, sont sur un sol limono-sableux, bien alimenté en eau, ne présentant pas de contraintes hydrique pendant tous les stades de développement. La profondeur des sols exploitée par les racines est d'environ 2 mètres et l'espacement des souches est de 3 x 1 m, avec un rendement de 80 quintaux/ha, une hauteur de feuillage de 1 m établie en double cordon, la végétation est maintenue par un fil porteur. Les inter-rangs sont travaillés et un désherbage est réalisé sous le rang. La parcelle n'est pas irriguée et elle n'a pas reçu d'apport de fertilisants. Tous les traitements phytosanitaires sont réalisés par l'exploitant et les raisins sont de ce fait traités de façon homogène. Ce traitement est appliqué au stade 2-3 feuilles pendant le mois de mai, avant complète floraison, contre le mildiou et l'oïdium.

2.2 Parcelle 2

Cette parcelle présente les mêmes caractéristiques que la première, sauf concernant sa localisation, où elle est localisée sur le côté opposé par rapport à la première et que le sol ayant une structure limono-sableuse mais avec un pourcentage élevé en limons (60%) par rapport au premier site (52%).

2.3 Parcelle 3

Cette parcelle est située au niveau de la région de Boutheldja (El-Tarf), elle a été implantée depuis 1973, constitué de plusieurs variétés greffées sur le porte-greffe "SO4". Les plantes, âgées de 39 ans, sont sur un sol limono-sablo-argileux, bien alimenté en eau, ne présentant pas de contraintes hydriques pendant tous les stades de développement. La profondeur des sols exploitée par les racines est d'environ deux mètres et l'espacement des souches est de 3 x 1 m. La hauteur de feuillage est de 1 m établie en double cordon, la végétation est maintenue par un fil porteur. Les inter-rangs sont travaillés et un désherbage est réalisé sous le rang. La parcelle n'est pas irriguée et elle n'a pas reçu d'apport de fertilisants, mais a reçu de l'azote foliaire (0,46%) par pulvérisation. Tous les traitements phytosanitaires sont réalisés par l'exploitant et les raisins sont de ce fait traités de façon homogène. Ce traitement est appliqué au stade 2-3 feuilles pendant le mois de mai, avant complète floraison, contre le mildiou et l'oïdium.

2.4 Parcelle 4

La parcelle est située au niveau de la région de Ben M'hidi (El-Tarf), elle a été implantée depuis 2007, mais la production proprement dite a débuté en 2011, constitué d'une seule variété "Victoria" importée de l'Italie. La densité de plantation de 1600 pieds/ha. Les plantes, âgées de 5 ans, sont sur un sol limono-sableux, bien alimenté en eau, ne présentant pas de contraintes hydriques pendant tous les stades de développement. La profondeur des sols exploitée par les racines est d'environ deux mètres mais superficiellement et l'espacement des souches est de 3 x 3 m, avec un rendement moyen de 40 à 60 tonnes/ha, une hauteur de feuillage d'environ 3 m établie en mode pergola, la végétation est maintenue par un fil porteur. Les inter-rangs sont travaillés et un désherbage est réalisé sous le rang. La parcelle est irriguée au goutte à goutte par des conduites maintenues sur les raisins, elle a reçu un apport de fertilisants solides (engrais phosphorique) par épandage à raison de 6 quintaux/ha en fin octobre – début novembre, les engrais azotés par la ferti-irrigation ainsi que les oligo-éléments (Ca, Fe, Cu et Zn). Tous les traitements phytosanitaires sont réalisés par l'exploitant, sachant que cette culture a été touchée par l'oïdium en 2012 et a été sujet à un traitement phytosanitaire intensif chaque 3 à 4 jours. La culture a eu un retard de croissance (phase de débournement) de 3 semaines à cause des inondations qui ont touchées cette zone le 22/02/2012 et le 11/03/2012.

Les principales caractéristiques des parcelles étudiées sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau II : Caractéristiques viticoles et topographiques des parcelles expérimentales

Site	1	2	3	4
Système de culture	Cordon royat	Cordon royat	Cordon royat	Pergola
Port-greffe	SO4	SO4	SO4	/
Age de la vigne (année)	32	32	39	5
Ecartement x espacement	3.0 x 1.0	3.0 x 1.0	3.0 x 1.0	3.0 x 3.0
Situation topographique	Plaine	Plaine	Plaine	Plaine
Texture du sol	Limono-sableuse	Limono-sableuse	Limono-sablo-argileuse	Limono-sableuse
Irrigation	Non-irrigué	Non-irrigué	Non-irrigué	Goutte à goutte (voie aérienne)
Traitement de fertilisation	/	/	Azote foliaire	Fertilisants azotés et phosphoriques avec les éléments traces (Ca, K) par la fertiirigation
Variétés prélevées	Cardinal	Cardinal et Gros noir	Muscat blanc et Muscat noir	Victoria
Date d'échantillonnage	15/07/2012	15/07/2012: Cardinal 04/08/2012: Gros noir	04/08/2012	04/08/2012

3. Analyse physico-chimiques des échantillons de sol

Au niveau des quatre sites, un prélèvement d'échantillon de sol à été réalisé et cela en mai 2012 afin de déterminer leurs caractéristiques physico-chimiques ; les méthodes d'analyses suivies sont celles utilisées au niveau du laboratoire de l'écopédologie de l'université d'Annaba. Les analyses effectuées sont les suivantes :

- **Détermination du pH et de la conductivité électrique (NF X 31-117 . NF ISO 10390)**

Une quantité du sol séché (5 ± 0.01 g) et 25 ml d'eau sont mélangés et agités pendant 5 min. Après 1 h de repos, le pH_{eau} et la conductivité électrique sont mesurés sous agitation à l'aide d'un pHmètre (HANNA 209) et d'un conductimètre (HANNA HI, 8733) préalablement étalonnés. Le pH_{KCl} est mesuré comme précédemment dans une solution de KCl à 1M. Pour la conductivité, les résultats sont exprimés en milli Siemens par cm.

- **Détermination de l'humidité (%) (Méthode de dessiccation)**

Une quantité de 5 ± 0.01 g du sol est séchée à l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant, l'humidité est déterminée par différence de poids.

- **Détermination de la densité apparente (g/cm^3)**

Elle correspond au poids du sol par unité de volume du sol sec en place.

- **Détermination de la densité réelle (g/cm^3)**

Elle est le poids réel de la matière constitutive de ce sol, abstraction faite de la porosité.

- **Détermination de la porosité (%)**

$$\text{Porosité} = (\text{Densité réelle} - \text{Densité apparente}) / \text{Densité réelle}$$

- **Détermination de la teneur en carbone organique et en matière organique (MO)**

La teneur en carbone organique est déterminée par la méthode d'Anne afin de déterminer la matière organique intervenant dans la fourniture d'éléments nutritifs et ayant une action sur la stabilité structurale des sols et sur la fixation des éléments nutritifs. Dans la méthode d'Anne, 0.5 à 1.5 g de l'échantillon sont oxydés par un excès de bichromate de potassium (10 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1 N) en présence d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) (20 ml) pendant 30 minutes. On admet que l'oxygène consommé est proportionnel au carbone que l'on veut doser. L'excès de bichromate inutilisé dans la réaction est dosé par le sel de Mohr.

La teneur en matière organique est calculée en fonction de la teneur en carbone déterminée par la méthode d'Anne.

$$\text{MO \%} = 1.724 * \text{C \%}$$

- **Détermination du calcaire total (%)**

La teneur en calcaire total est obtenue par la mesure du volume de dioxyde de carbone dégagé par 5 g de terre fine sèche sous l'action de l'acide chlorhydrique (50 ml HCl, 1N) à température ambiante.

- **Détermination du calcaire actif (%) (NF X 31-106)**

Il est réservé aux échantillons contenant plus de 5% du calcaire total. Il s'agit de doser, par titration au permanganate de potassium N/10, 20 ml d'oxalate N/5, et 20 ml de filtrat de sol obtenu après agitation pendant 2 heures à l'agitateur rotatif, la fraction chimiquement active du calcaire du sol. La différence entre les deux titrages correspond pour la partie aliquote à la quantité du calcium de carbonates ayant réagi sur l'oxalate d'ammonium.

$$\% \text{ CaCO}_3 \text{ actif} = 62.5 \times C \times (\text{Vo} - \text{Va})$$

C : concentration de la solution de permanganate de potassium (mol/l)

Vo : volume de permanganate de potassium versé pour l'essai à blanc (ml)

Va : volume de permanganate de potassium versé pour l'essai (ml)

- **Détermination de la teneur en azote total (NF X 31-11 - NF ISO 11261)**

Le dosage de l'azote total des sols est réalisé par la méthode normalisée de Kjeldahl. La détermination de l'azote total Kjeldahl s'effectue en deux étapes. La première étape est une digestion en milieu acide qui transforme tous les composés organiques azotés en azote ammoniacal. Dans la seconde étape, les ions ammonium sont transformés en ammoniac (NH_3) par passage en milieu alcalin (NaOH). On entraîne NH_3 à la vapeur d'eau et on dose le condensat recueilli par dosage volumétrique acide/base.

- **Détermination de la teneur en Nitrites (NO_2^-) (mg/kg du sol) (méthode du réactif Zambilli)**

L'acide sulfamilique en milieu chlorhydrique, en présence d'ion ammonium et de phénol forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré en jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en nitrites, déterminée par spectrophotométrie.

- **Détermination de la teneur en ammonium (NH_4^+) (mg/kg N) (ISO 7150-1, DIN 38406 E5 ; EPA 350.1)**

La détermination de la teneur en ammonium est réalisée avec la méthode au bleu indophénol : spectrophotométrie APHA 4500- NH_3 F.

- **Détermination de la teneur en chlorures (Cl) (mg/l)**

La teneur en chlorures des échantillons est déterminée par la méthode de Mohr. Les chlorures sont dosés en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

- **Détermination de la texture (Analyse granulométrique) (AFNOR NF X31-107).**

Les particules minérales constituant d'un sol peuvent être isolées, triées et classées suivant leurs tailles, c'est le principe de l'analyse granulométrique. L'analyse granulométrique est réalisée suivant la méthode de la pipette "ROBINSON" normalisée. Après séparation de la terre fine (fractions inférieures à 2 mm) des éléments grossiers (graviers, cailloux, blocs), et destruction des ciments organiques par l'action de l'eau oxygénée (H_2O_2 , 30 % v/v) et d'un acide fort, la terre fine est dispersée dans l'eau additionnée d'un agent dispersant. Les particules vont ensuite lentement sédimenter en fonction de leur taille et de la température de l'eau. Des prélèvements à la pipette à différents pas de temps permettent de récupérer les particules restant en solution. Cette méthode permet de déterminer les valeurs en argile et

limons fins. Les fractions plus grossières, sables grossiers, sables fins et limons grossiers sont déterminées par tamisage, après lavage des fractions fines déterminées par sédimentation. La somme de ces 5 fractions granulométriques minérales est égale à 100%.

- **Détermination de la teneur en hydrogénocarbonates (HCO_3^-)(mg/l)**

La détermination des carbonates et bicarbonates est réalisée par titrimétrie par l'acide sulfurique 0.02 N, en présence de la phénolphthaléine et de méthyle orange comme indicateurs colorés.

4. Caractéristiques climatiques de l'année de récolte des échantillons

Les différents sites d'étude présentent le même méso-climat, du fait qu'ils se trouvent proches l'un de l'autre et présentent les mêmes caractéristiques topographiques (altitude et pente). D'après les données climatiques (tableau III) et le diagramme ombrothermique (Fig. 24), les données montrent que l'on est dans un climat *Méditerranéen à été chaud*, les précipitations annuelles moyennes de 610.5 mm, la température annuelle moyenne de 18.5 °C avec une amplitude thermique de 17.1°C.

Le tableau III récapitule quelques données climatiques de la région d'étude pendant l'année de prélèvement des échantillons

Tableau III: Données climatiques de la région d'étude (2012)

Mois	T°C min*	T°C max*	Humidité (%) min**	Humidité (%) max**	Précipitations (mm)/mois	Jours de pluie/mois
Janvier	5.8	16.03	82.87	89.83	55.50	7
Février	5.0	13.03	64	99	203	13
Mars	8.8	18.80	69	98	57.20	9
Avril	10.8	21.60	84	98	72	6
Mai	11.92	25.63	55	95	16	5
Juin	16.95	31.20	46	98	16.1	4
Juillet	19.85	32.38	51	98	0	0
Aout	20.22	30.06	42	96	18.50	1
Septembre	17.73	30.11	68	75	64.50	3
Octobre	19.85	27.50	72.02	87.76	45.50	5
Novembre	11.40	23.55	68	75	44.50	4
Décembre	7.06	17.71	75	78	170.70	10

*La température est présentée en moyenne mensuelle

**L'humidité est présentée en moyenne mensuelle

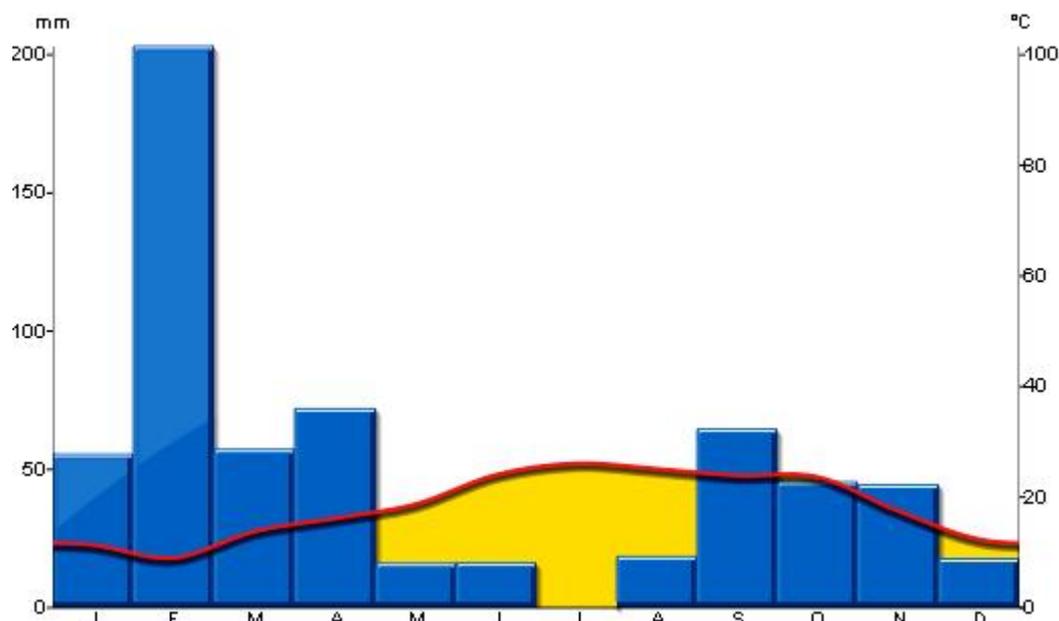


Figure 24. Diagramme ombrothermique de la région d'étude pour l'année 2012

La partie en jaune : représente la période de sécheresse (lorsque la courbe des températures passe au dessus des bâtonnets des précipitations).

- La température moyenne du mois le plus froid (février : 9°C) est comprise entre -3°C et 18°C ;
- La température moyenne du mois le plus chaud (juillet : 26.1°C) est supérieure à 10°C ;

✘ *Climat humide*

- 3 fois plus de précipitations aux mois d'hiver les plus arrosés (février : 203 mm) qu'aux mois d'été les moins arrosés (juillet : 0 mm) ;
- Précipitations annuelles (610.5 mm) supérieures à 20 fois la température moyenne annuelle ($20 \times 18,5^{\circ}\text{C} \approx 369.2$)

✘ *Méditerranéen*

- 3 fois plus de précipitations aux mois d'hiver les plus arrosés (février : 203 mm) qu'aux mois d'été les moins arrosés (juillet : 0 mm) ;
- Le mois d'été le moins arrosé (juillet : 0 mm) reçoit moins de 30 mm

✘ *Été chaud*

- La température moyenne du mois le plus chaud (juillet : 26,1°C) est supérieure à 22°C
- Au moins 4 mois au-dessus de 10°C : (juillet : 26,1°C) ; (août : 25,1°C) ; (juin : 24,1°C) ; (septembre : 23,9°C).

5. Récolte des baies de raisins

Les raisins utilisés dans cette étude sont récoltés à maturité optimale, selon les résultats de mesure du degré Brix. Le prélèvement des échantillons est réalisé de manière méticuleuse, tout en évitant d'endommager les baies. Pour chaque variété, deux échantillons ont été prélevés ; l'un pour l'analyse physico-chimique et l'autre pour le dosage des antioxydants. Le prélèvement a été effectué selon les indications suivantes :

- Près puis loin du cep :
 - Face exposée haut ;
 - Face exposée bas ;
 - Face non exposée bas ;
 - Face non exposée haut
 - A droite ;
 - A gauche.

- Les baies sont prélevées avec pédicelles afin d'éviter leur endommagement au cours du transport ;

- Les prélèvements sont placés dans des boîtes en plastiques propres, sèches, rigides et hermétiques, et sont rapidement transportés et conservés ;

- Chaque boîte est clairement identifiée ;

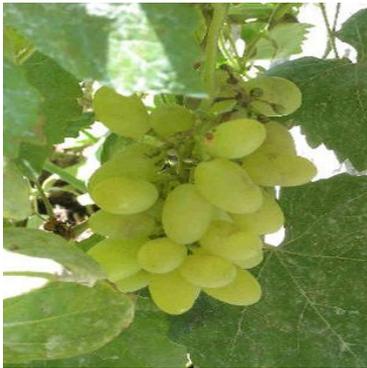
- Les échantillons destinés pour l'analyse physico-chimique sont conservés à +4°C et analysés le lendemain, tandis que les échantillons destinés pour l'extraction des composés phénoliques sont aussitôt conservés au congélateur à environ -18°C en attendant la mise en œuvre des analyses.

La figure suivante représente les variétés de raisins prélevées :



Cardinal

Les grappes sont assez grandes, longues et lâches facilitant ainsi la bonne pénétration du soleil. Le raisin est rouge foncé à violet. Les baies sont fermes et charnues, la peau est épaisse avec une saveur simple ou très légèrement musquée à maturité complète. Ce cépage est vigoureux, de bonne qualité, il s'adapte bien à toutes les conduites. Ce cépage est très précoce. Il arrive à bonne maturité fin Juillet, voir début Août, c'est l'un des premiers à être présent sur le marché, dès le début du mois d'août.



Victoria

Raisin blanc (production italienne) très connu et apprécié pour sa précocité et pour sa belle grappe. Variété qui supporte le transport et se conserve longtemps au fruitier.

Grappe: moyenne à grande, à forme cylindrique-conique, épaulée, ferme, poids moyen 600-800 g.

Baies : ovoïdales ou elliptiques, très sucrées, poussent partout et aiment le soleil. Maturité en fin août-début octobre. Les grappes se conservent parfaitement bien sur le pied de vigne, les grappes sont grosses



Muscat noir

Il présente de petites baies de forme plutôt allongée dont la peau est relativement fine. On le récolte jusqu'au mois de novembre. Variété ancienne largement appréciée pour sa saveur très aromatique; la noble saveur. Récolté de début août à mi-octobre, est facilement reconnaissable à sa couleur caractéristique « bleutée noire », sa saveur sucrée, sa texture onctueuse et son goût musqué.



Gros noir

Est une variété donnant de grosses grappes aérée et très allongée, baie très grosse, noire, ronde à chair ferme et juteuse. Saveur aromatique caractéristique de la variété. Variété très fertile dont les raisins se conservent très bien après cueillette. Elle est récoltée de mi-août jusqu'à la mi-octobre. A planter dans un sol ordinaire ou drainé en exposition ensoleillée.



Muscat blanc

Les grappes et les baies sont de taille moyenne. La grappe est cylindrique, longue, étroite et compacte. Baies sphériques de couleur dorée se couvrant de points roux à complète maturité. La pellicule est épaisse, la chair ferme, gorgée de jus et très sucré. Le cépage possède une saveur aromatique musquée.

Figure 25. Variétés de raisins prélevés et leurs caractéristiques

6. Analyses physico-chimiques des jus de raisins

Les jus obtenus à partir des variétés objet de cette étude, ont subi des analyses physico-chimiques correspondant aux critères de qualité après avoir été pressés et séparés par filtration. Les analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire de Contrôle de la Qualité et de l'Étiquetage (CAQUE) de la wilaya d'Annaba et les méthodes utilisées sont celles décrites dans la norme algérienne du journal officiel **NA 301 : Jus de raisin : spécification – 1989**.

- **pH** : la mesure du pH du jus de raisin a été faite à l'aide d'un pH-mètre de paillasse (Hanna, pH-210).
- **Acidité** (méthode NFV 05 – 101) : l'acidité est déterminée par la méthode suivante : un volume de jus est neutralisé par la solution d'hydroxyde de sodium (0.1N), en présence de quelques gouttes de phénolphtaléine, jusqu'à un virage de la couleur au rose. L'acidité est exprimée en %.
- **Densité** : La densité des jus est mesurée en utilisant un pycnomètre à 20°C.
- **Taux de Brix** (Méthode 08 – 96 – 02) : le pourcentage de Brix est défini comme étant le taux de glucides exprimé en g/100g de jus ; il est déterminé par lecture directe sur un réfractomètre (CarlZeiss Jena) et les résultats sont donnés en %.

7. Dosage des antioxydants sur les baies entières (raisins frais)

7.1 L'acide ascorbique

La méthode d'oxydo-réduction décrite par **Njoku et al. (2011)** modifiée, a été utilisée pour l'estimation de la teneur en acide ascorbique ; il s'agit d'une titration directe 10 ml du jus de raisin avec l'iode (I_2) en présence de l'empois d'amidon comme indicateur coloré. Les résultats sont exprimés en mg de vitamine C/100 ml de jus.

7.2 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont extraits par la méthode de **Sass-Kiss et al., (2005)**. Brièvement, 20 ml du mélange de solvants d'extraction (hexane/acétone/éthanol, 2:1:1) sont ajoutés à 10 g du broyat de raisin. Après agitation pendant 30 min, la phase supérieure est récupérée en la protégeant de la lumière. Sont ajoutés 10 ml d'hexane pour une deuxième extraction. Le mélange des deux phases hexaniques est utilisé pour le dosage des caroténoïdes totaux par spectrophotométrie à 420 nm.

Les concentrations en caroténoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage en utilisant le β -carotène comme standard et les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche.

7.3 Les polyphénols

7.3.1 Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure.

Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques, l'extraction solide-liquide est la procédure suivie (macération). Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tels que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs les mélanges d'alcool - eau sont recommandés (**Naczk et Shahidi, 2004**).

Les échantillons de raisin sont lavés avec l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée avant l'extraction par macération qui s'effectue à température ambiante. Elle est généralement utilisée pour l'extraction de composés sensibles à la chaleur comme les composés phénoliques.

7.3.2 Simplification et validation de la méthode d'extraction des polyphénols

Dans la littérature, les méthodes d'extractions des composés phénoliques sont très diverses et leur efficacité dépend de la nature des composés à extraire (**Naczk et Shahidi, 2004**). Nous avons donc décidé de réaliser une étude sur le fruit afin de valider notre protocole d'extraction ; pour cela l'eau et trois autres solvants organiques ont été testés, ces derniers à différentes dilutions, il s'agit du méthanol, acétone et éthanol à 80%, 60%, 40% et 20% ; les solvants purs n'ont pas été testés puisqu'il a été observé qu'ils présentaient des capacités d'extraction plus faible pour les polyphénols, particulièrement les tanins (**Naczk et al., 1992**) ; en outre, différentes températures (25°C, 40°C, 50°C, 60°C et 70°C), différents temps d'extraction (30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 180 min) et plusieurs extractions successives ont été testées.

a) Comparaison des quatre solvants

De chaque solvant testé (eau distillée, méthanol, acétone et éthanol), 20 ml ont été mélangés avec 10 g du broyat de raisin. Le mélange est placé dans un bain Marie sous agitation pendant 30 min à 25°C.

Il existe des différences significatives ($p < 0.05$) entre les divers solvants testés et cela par rapport à la quantité de composés phénoliques extraite. Le méthanol à 80% a montré la capacité d'extraction la plus élevée de polyphénols totaux (PPT) sur les raisins frais. **Le méthanol à 80% est donc resté notre solvant d'extraction.**

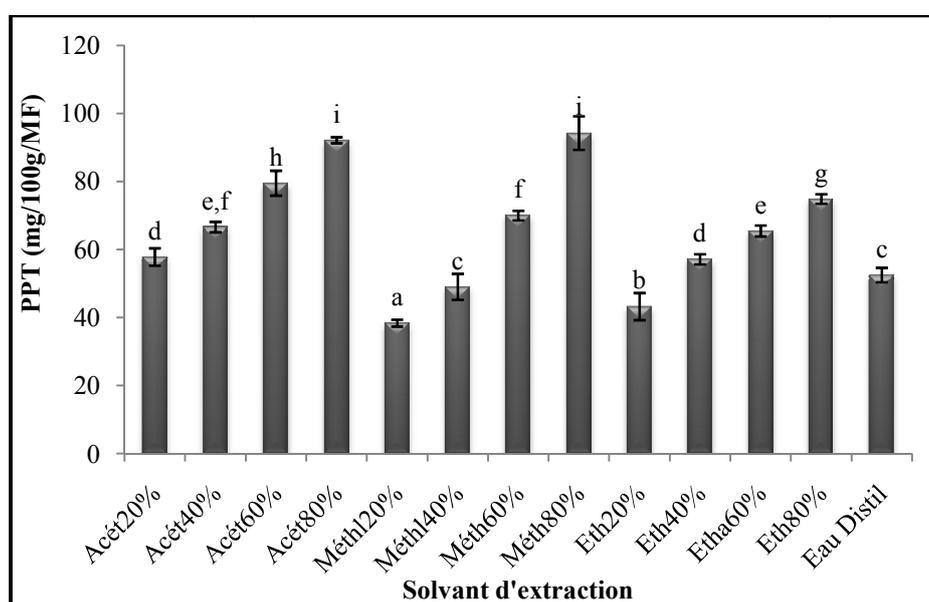


Figure 26. Influence du type de solvant et du rapport alcool/eau sur l'extraction des PPT

Les barres verticales représentent les écart types ($n = 3$)

Des lettres différentes indiquent des résultats différents ($p < 0.05$).

b) Optimisation du temps d'extraction des PPT

Il a été démontré que les temps d'extraction courts limitaient la dégradation des molécules, mais en augmentant la durée, l'extraction était meilleure ; ce qui est montré dans les travaux de **Wissam et al. (2012)** sur le grenadé et ceux de **Kossah et al. (2010)** sur le Sumac syrien et chinois.

Pour tester l'impact du temps d'extraction, quatre différentes durées ont été choisies (30 min, 60 min, 90 min, 120 et 180 min) afin d'extraire les polyphénols sur 10 g de matière fraîche de purée de raisin

La teneur en composés phénoliques diffère de manière significative ($p < 0.05$) suivant les durées d'extraction testées. **Le taux maximal d'extraction est obtenu à 30 min.**

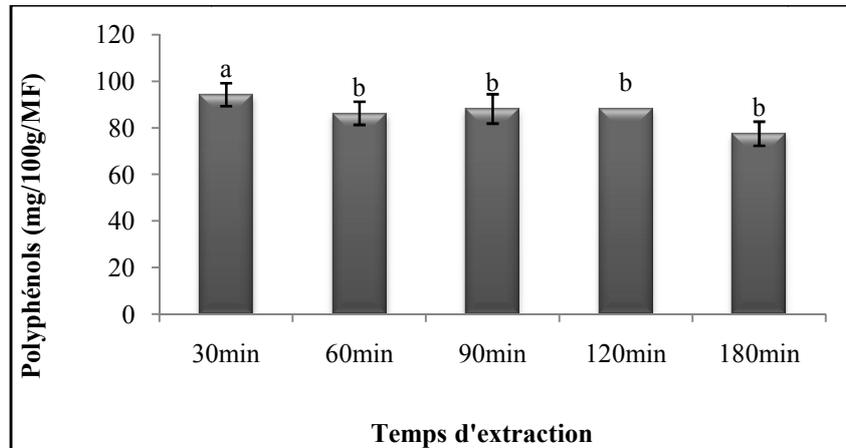


Figure 27. Influence du temps sur l'extraction des PPT

Les barres verticales représentent les écart types ($n = 3$)
Des lettres différentes indiquent des résultats différents ($p < 0.05$).

c) Optimisation de la température d'extraction des PPT

Il a été démontré dans plusieurs travaux qu'en augmentant la température, le rendement d'extraction des polyphénols augmente mais au-delà d'un certain seuil, le rendement diminue ou ne change plus (Ruenroengklin *et al.*, 2008 ; Kossah *et al.*, 2010). Nous avons donc voulu vérifier la température optimale qui apportait d'assez bons résultats.

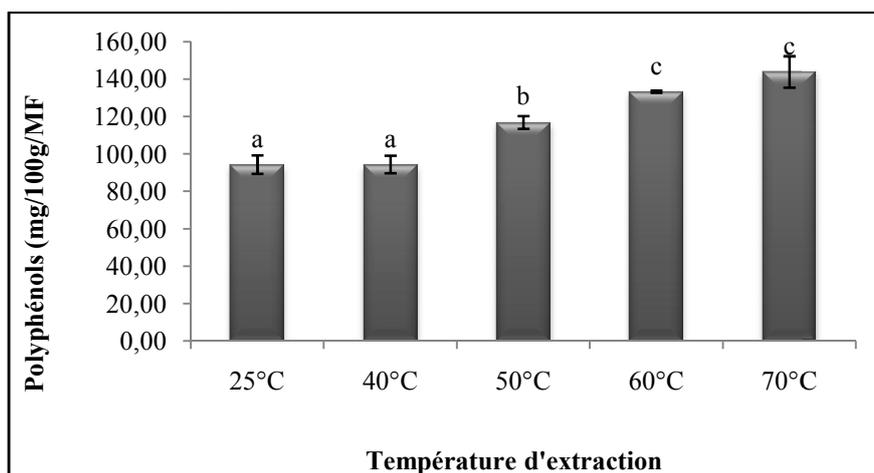


Figure 28. Influence de la température sur l'extraction des PPT

Les barres verticales représentent les écart types ($n = 3$)
Des lettres différentes indiquent des résultats différents ($p < 0.05$).

Les différentes températures testées montrent des effets significatifs ($p < 0.05$) sur le taux de PPT extraits des raisins et cela jusqu'à 60°C , mais au-delà il n'y a pas de différences significatives. D'après ce résultat, 60°C peut être retenue comme température optimale d'extractions des composés phénoliques des raisins. Mais d'après **Sun et Spranger (2005)** et **Cadot (2012)**, bien que les températures élevées améliorent les rendements, mais elles peuvent dégrader les proanthocyanidines, dont le raisin est riche, et peuvent provoquer l'apparition de composés néoformés qui absorbent à la même longueur d'onde que les composés phénoliques, donc, d'un point de vu quantitatif et pratique, il est préférable que l'extraction des composés phénoliques soit faite à **température ambiante (25°C)**.

d) Optimisation du nombre d'extraction

Les paramètres solvant, durée et température d'extraction sont fixés d'après ce qui est obtenu des étapes précédentes, et l'extraction a été répétée trois fois successivement sur le résidu solide obtenu après centrifugation du mélange à 3000 rpm/15 min.

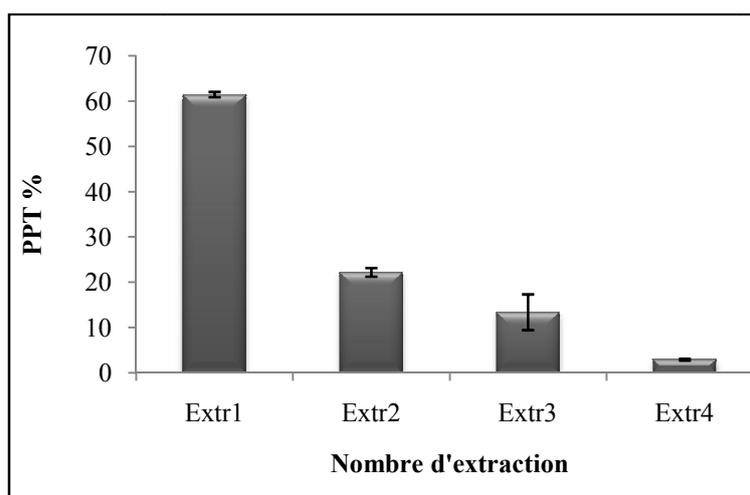


Figure 29. Influence du nombre d'extractions successives sur le taux de PPT extraits

Les barres verticales représentent les écart types ($n = 3$)

D'après les résultats obtenus, il est clair que **trois séries d'extractions successives** apparaissent suffisantes pour extraire le maximum de PPT et épuiser ainsi le matériel végétal.

e) Conclusion

Avec ces expérimentations, nous avons pu valider notre protocole d'extraction des composés phénoliques totaux sur des raisins frais par rapport à d'autres techniques développées dans la littérature. Les résultats de l'optimisation ont fait l'objet d'une publication présentée en annexe n° 2.

7.3.3 Dosage des composés phénoliques des raisins frais

a) Dosage des polyphénols totaux (PPT) par le réactif de Folin-Ciocalteu

Le dosage des PPT a été effectué suivant la méthode décrite par **Nickavar et al. (2008)** modifiée ; brièvement, 50 µl de l'échantillon ou l'une des concentrations de la gamme des étalons (0, 50, 100, 150, 250 et 500 mg/ml d'acide gallique) sont mélangés à 5 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10) et incubé à température ambiante. Après 10 min, 4 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (75 g/l) sont ajoutés. La solution finale est bien mélangée et gardée à l'obscurité pendant 30 min. l'absorbance est lue à 765 nm et la teneur en composés phénoliques est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de matière fraîche (mg EAG/g MF).

b) Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Le dosage de FT a été effectué selon la méthode de **Kim et al. (2003)** modifiée. Les réactifs utilisés sont les solutions incolores de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

Les FT sont évalués par colorimétrie, dans un tube à essai de 10 ml sont introduits successivement 250 µl de l'extrait ou l'une des concentrations de la gamme étalons (20 – 260 µg/ml de catéchine) et 1 ml d'eau distillée. Au temps initial (0 minute) sont ajoutés 75 µl d'une solution de NaNO_2 (5%), après 5 minutes, 75 µl de AlCl_3 (10 %) sont ajoutés. Et à 6 minutes, 500 µl de NaOH (1N) et 2.5 ml d'eau distillée sont ajoutés successivement au mélange. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre à 510 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine/ g de matière fraîche (mg EC/g MF).

c) Détermination de l'activité antioxydante (Pouvoir réducteur)

Le pouvoir réducteur d'extraits de raisin a été estimé par la méthode décrite par **Jayaprakash et al. (2001)** modifiée. Brièvement, 1ml d'extrait de raisin est ajouté à 2.5 ml du tampon phosphate (0.2M, pH6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) (1%). Le mélange est incubé à 50°C/20 min ; au terme de l'incubation, 2.5 ml d'acide trichloracétique

TCA (10%) sont additionnés au mélange ; un aliquote de 2.5 ml du mélange est prélevé et mélangé dans un tube à essai avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure ferrique (FeCl_3) (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec l'acide ascorbique et les résultats sont exprimés en mg d'antioxydants équivalents en acide ascorbique/g de matières fraîches (mg EAA/g MF).

8. Analyse des composés phénoliques des pépins et pellicules

Les pellicules et les pépins de chaque variété ont été séparés manuellement de la pulpe, lavés et séchés dans une étuve à 50°C jusqu'à poids constant. Les pépins et pellicules ainsi séchés sont alors broyés jusqu'à obtenir une poudre, pesés et conservés dans des flacons opaques dans un congélateur jusqu'à l'analyse. Sur chaque poudre obtenue, la quantification et l'identification des composés phénoliques présents a été réalisée par le biais de la chromatographie liquide haute performance à barettes de diodes (*HPLC* pour *High Performanc Liquid Chromatography*).

Deux procédures d'extraction ont été développées et optimisées pour chacune des parties de la baie étudiée : pépin et pellicule. Les méthodes sont les suivantes (**Cadot *et al.*, 2012**) :

8.1 Extraction à partir des pellicules

L'extraction des composés phénoliques des pellicules a été réalisée par macération de 2 g de poudre de pellicules dans, successivement 80 ml d'alcool méthylique / eau / TFA (80:20:0.05) et 50 ml d'un mélange acétone / eau (60:40). L'extraction a été répétée deux fois et réalisée dans les mêmes conditions (25°C/15 min sous agitation à 250 rpm). L'extrait ainsi obtenu a été centrifugé (10°C/10 min/10000 rpm), le surnageant récupéré a été filtré sur un papier en microfibre de verre GF / A Whatman ® 1.6 µm. Le solvant a été éliminé par évaporation sous vide (jusqu'à ce que la quantité soit inférieure à 1 ml) à 30°C dans un évaporateur rotatif Buchi ® R-111 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse). Le concentré obtenu a été repris dans 5 ml du méthanol, c'est l'extrait brut de pellicules. Une quantité de 2 ml de cet extrait a été conservé par congélation à - 80°C et 2 ml ont subi un fractionnement pour des analyses ultérieures.

8.2 Extraction à partir des pépins

Une quantité de 0.1 g de poudre de pépins pesée avec une balance de précision est soumise à l'extraction par macération dans 50 ml d'un mélange acétone / eau (60:40) et 300 µl de méthyl-4-hydrobenzoate à 1 g/l, sous agitation pendant 70 min. Le mélange ainsi obtenu est

centrifugé (10 rpm à 10°C / 10 min), le surnageant a été ensuite filtré sur un filtre GF/A de 1.6 µm dans un ballon évaporateur de 250 ml. Le filtrat a été évaporé à 30°C dans un évaporateur « rotavapor Buchi RE111 » jusqu'à ce que la quantité soit inférieure à 1ml. Le concentré ainsi obtenu a été repris progressivement avec une solution de méthanol dans une fiole, puis complété à 5 ml pour obtenir l'extrait brut des phénols des pépins. L'extraction a été effectuée en double. Comme pour l'extrait brut de pellicules, 2 ml de cet extrait ont été conservés à – 80°C et 2 ml ont subi une chromatographie de fractionnement pour des analyses ultérieures.

8.3 Dosage des anthocyanes totales

Le dosage des anthocyanes des extraits de pellicule, suivant la méthode de décoloration au bisulfite de sodium, s'effectue en utilisant deux propriétés dues à leurs structures :

- La modification de leurs couleurs en fonction du pH
- La transformation en dérivés incolores sous l'action de certains réactifs comme les ions bisulfite

Ainsi, la variation de l'absorbance lue à 520 nm après addition d'ions bisulfite en excès, est proportionnelle à la teneur en anthocyanes.

✘ Réactifs

- Une solution d'éthanol à 95 % acidifiée à 0,1 % avec de l'acide chlorhydrique pur (HCl)
- Une solution d'HCl à 35 % diluée à 2 % dans de l'eau distillée
- Une solution de bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) à 150 g/l

✘ Mode opératoire

- Dans un tube à essai, mélanger 1 ml d'extrait pelliculaire ; 1 ml de la solution d'éthanol et 20 ml de la solution d'HCl
- Préparer des cuves pour le spectrophotomètre comme suit :
- Cuve A : 5 ml du mélange + 2 ml d'eau déminéralisée
- Cuve B : 5 ml du mélange + 2 ml de bisulfite
- Traiter d'abord les cuves sans bisulfite pour éviter toute décoloration par les résidus
- Attendre 20 min, en laissant les tubes à l'obscurité.

✘ Résultats

- Faire une lecture de densité optique à 520 nm ; soit DOa la densité optique obtenue pour le tube A et DOb celle pour le tube B. On peut exprimer approximativement la variation d'absorbance (DOa-DOb) par :

$$[\text{Anthocyanes}] \text{ mg/l} = (\text{DOa-DOb}) \times 875$$

875 : pente de la droite d'étalonnage obtenu à partir de malvidine-3-glucoside.

8.4 Dosage des tanins totaux

Le dosage des tanins repose sur la particularité qui ont les tanins à se décomposer, en milieu acide, en anthocyanes de couleur rouge

✘ Réactifs

- Ethanol à 95 %
- HCl pur (12N)

✘ Matériel

Matériel courant de laboratoire, dont :

- 2 tubes fermés émeri et clapets
- Tubes gradués de 5 ml et 10 ml
- Bain marie 97°C
- Spectrophotomètre UVIKON 933 (550 nm)

✘ Mode Opérateur

- Diluer une partie aliquote de l'extrait de pellicule et de pépins (1:50)
- Pour chaque extrait dilué, préparer dans deux tubes:
 - 4 ml de l'extrait dilué
 - + 2 ml d'eau déminéralisée
 - + 6 ml de HCl (12 N)
 - Fermer hermétiquement les deux tubes
 - Chauffer 1 tube à 97 °C au bain marie
 - Maintenir 1 tube à température ambiante.
 - Après 30 minutes, ajouter 1 ml d'éthanol (95 %) dans chaque tube
 - Après agitation (manuelle, 4 retournements) mesurer l'absorbance à 550 nm pour chaque tube.

✖ Résultats

La « concentration » en tanins est obtenue en multipliant la différence entre les deux absorbances par 19.33.

8.5 Caractérisation de la composition phénolique des extraits bruts

Afin de déterminer la composition des pellicules et pépins en polyphénols monomères, les extraits polyphénoliques ont été analysés directement par HPLC sur colonne en phase inverse. C'est une chromatographie de partage entre une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide.

8.5.1 Anthocyanes et flavonols par HPLC

Le matériel chromatographique se compose d'un module de séparation de marque WATERS 2965 (incluant un système de pompage, un injecteur automatique, un échantillonneur), d'une colonne PHENOMENEX KINETEX 18 RP 100 Å 5 µm (250x4.6), d'un détecteur WATERS 2996 (PDA) à barrette de diodes. Tous les solvants et échantillons sont filtrés sur une membrane HVLP 0.45µm (Millipore). La température de travail est celle de l'atmosphère ambiante.

Pour les anthocyanes et flavonols, les analyses ont été effectuées sur les extraits bruts suivant les conditions décrites par **Roggero et al. (1992)**. Une quantité de 20 µl filtré de chaque extrait brut de pépin et pellicule a été directement injectée dans l'appareil sous les conditions suivantes : débit 0.8ml/min ; la phase mobile est un gradient binaire constitué par deux solvants acide formique/eau (10:90, v/v; solvant B) dans acide formique/eau/acétonitrile (10:60:30, v/v; solvant A), élution suivant un profil linéaire avec 80-15 % du solvant B en 0-26 min et 15-80% en 26-30 min (tableau IV). Le dosage dure 30 minutes.

L'élution a été suivie par un détecteur à barrette de photodiodes Waters 2996 (265-650 nm) qui permet d'extraire et de visualiser les chromatogrammes qui nous intéressent : les anthocyanes à 520 nm, les flavonols à 360 nm, les acides phénols à 320 nm ± 1.2 nm. Toutes les analyses ont été effectuées en double.

Tableau IV: Gradient linéaire utilisé pour la séparation des flavonols et anthocyanes

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

Les composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et leurs spectres UV-Vis par comparaison avec des chromatogrammes références dans les mêmes conditions de travail. Les résultats sont exprimés en mg.kg^{-1} de baies en « équivalent 3-glucoside de malvidol » et en « équivalent 3-glucoside de quercétol » pour les anthocyanes et les flavonols, respectivement.

8.5.2 Caractérisation des polymères de flavan-3-ols (tanins)

a) Fractionnement des tanins

Les tanins sont des molécules très polaires qui sont solubles dans les solvants, tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Leur solubilité dépend de leur degré de polymérisation moyen (DPM). Les tanins à faible DPM (<6) sont solubles dans l'éthanol et le méthanol, ceux à DPM plus élevé (>6) sont solubles dans l'acétone. Leur extraction et leur fractionnement à partir du raisin se base sur cette particularité.

L'extrait brut obtenu comme décrit aux points 8.1) et 8.2) contiennent des tanins mais aussi des acides phénoliques et des composés polaires (anthocyanes, flavanols, polysaccharides,...), ces derniers donnent des pics chromatographiques visiblement bien séparés à l'HPLC, contrairement aux tanins qui donnent de larges pics non résolus. Plus le poids moléculaire augmente, moins la séparation des pics est bonne.

Afin d'obtenir une bonne séparation sur colonne HPLC, la fraction de flavanols polymères a été alors isolée, en utilisant une colonne Toyopearl® TSK - HW-40(F) (Tosoh Corporation, Japon) de 300 mm de longueur et 10 mm de diamètre interne contenant 10 cm de Fractogel. Ce gel permet théoriquement la séparation des molécules en fonction de leurs poids moléculaires. Cependant, dans le cas des flavonoïdes, la présence de groupements hydroxyles libres offre une possibilité de séparation par chromatographie d'adsorption. Ce gel présentant de plus une bonne résistance chimique et mécanique, a été très largement utilisé pour l'étude des proanthocyanidols (**Boukharta *et al.*, 1994 ; De Freitas *et al.*, 1998 ; Cadot *et al.*, 2006**). Le fractionnement a été réalisé suivant la méthode décrite par **Cadot *et al.* (2006), (2012)**. Après avoir conditionné la colonne avec 40 ml du mélange éthanol/eau/TFA (110:90:0:01), une partie aliquote (2ml) d'extrait brut de pellicule et pépins a été déposée en tête de la colonne, reliée à un détecteur UV. Une première élution a été effectuée avec 30 ml du mélange précédent à un débit de 1 ml.min^{-1} , dans laquelle on récupère les composés phénoliques monomères - acides phénoliques, flavonols, anthocyanes et les flavanols

monomères et dimères ; Suivie d'une deuxième élution avec 30 ml du mélange acétone/eau (60:40) à un débit de 1 ml.min⁻¹ dans laquelle on récupère les polymères de flavan-3-ols, à cette fraction, 300 µl d'étalon interne (50 mg de méthyl 4-hydroxybenzoate dans 100 ml du MeOH) ont été rajoutés. Le mélange obtenu a été concentré jusqu'à presque à sec dans un évaporateur rotatif BUCCHI « RE111 », à 30°C, le concentré ainsi récupéré est repris avec du méthanol pur dans une fiole de 2 ml, congelé à -80°C pour l'étape suivante (thiolyse et dosage par HPLC).

b) Thiolyse et dosage par HPLC

b.1) Thiolyse

C'est une réaction d'hydrolyse ou de dépolymérisation en milieu acide en présence d'un agent nucléophile fort : l'alpha-toluène thiol qui donne des informations supplémentaires sur la structure des tanins condensés. La rupture de la liaison interflavane (carbone-carbone) qui libère toutes les sous-unités flavane inférieures terminales telles qu'elles et toutes les unités intermédiaires et supérieures sous la forme de carbocations (4-flavanylecarbocations), puis celles-ci réagissent avec l'alpha-toluène thiol pour former des dérivés substitués en position 4 (flavanyles 4-benzyle thio-éther); les unités terminales sont conservées intactes sous la forme de monomères (Fig. 29). La stéréochimie de toutes les unités est conservée de même que les éventuels substituants tels que les galloylés et glycoylés.

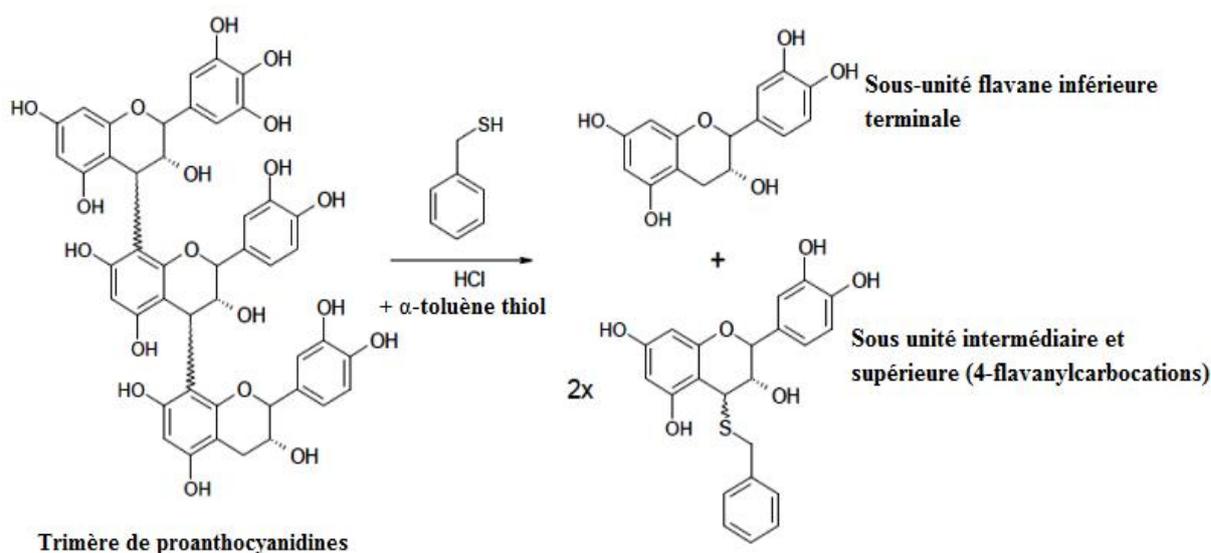


Figure 30. Fractionnement d'un trimère par thiolyse

De la fraction acétonique obtenue précédemment contenant les polymères de flavan-3-ols, 120 µl filtré à 0.45µm dans un flacon HPLC ont été mélangés avec 120 µl de réactif de thiolyse (benzylmercaptan à 2.5%). Le flacon scellé est porté à 90°C dans un bain marie pendant 2 min, puis rapidement refroidi avec de l'eau froide, afin d'arrêter la réaction. Cette méthode d'analyse permet la distinction entre les unités terminales libérés sous forme de flavan-3-ols et les unités intermédiaires et supérieures libérées sous forme de benzylthioethers (**Brossaud et al., 1999**). L'injection en HPLC du milieu permet de quantifier les teneurs et les proportions de chacune des unités constitutives et d'estimer ainsi le degré de polymérisation moyen (D_{Pm}) des tanins puisqu'il correspond au rapport de toutes les unités (terminales, intermédiaires et supérieures) sur le nombre d'unités terminales.

$$\text{D}_{Pm} = \frac{\Sigma \text{ toutes les unités (terminales + intermédiaires+ supérieures)}}{\Sigma \text{ unités terminales}}$$

b.2) Analyse par HPLC

Le matériel chromatographique se compose d'un module de séparation de marque WATERS 2965 (incluant, un système de pompage, un injecteur automatique, un échantillonneur), d'une colonne PHENOMENEX KINETEX 18 RP 100 Å 5 µm (250x4.6), d'un détecteur WATERS 2996 (PDA) à barrette de diodes.

Après la thiolyse, 20 µl de mélange réactionnel obtenu ont été alors caractérisés par HPLC, dans les conditions décrites par **Brossaud et al. (1999)** et **Cadot et al. (2012)** comme suit : Débit : 1 ml.min⁻¹, Durée de la chromatographie : 38 min, Température de la colonne 30°C, solvant A : eau / acide acétique (97.5:2.5); solvant B : acétonitrile /eau / acide acétique (80:17.5: 2.5), élution suivant un gradient linéaire (tableau V), puis un lavage et rééquilibrage de la colonne aux conditions initiales, détection à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 280 nm. L'analyse est effectuée en double. Les données quantitatives ont été obtenues pour chaque unité terminale après calibration avec un composé commercial. Pour les unités d'extension, les données quantitatives ont été obtenues après le calcul du coefficient d'absorption des composés purifiés correspondants qui ont été obtenues comme décrit par **Souquet et al. (1996)** et après examen de la quantification de l'étalon interne dans le chromatogramme.

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

Temps	% A	%B
0	95	5
3,4	88,5	11,5
5	80	20
23	50	50
25	40	60
28	5	95
32	5	95
35	95	5
38	95	5

9. Analyse statistique des données

Les données sont présentées sous forme d'une moyenne \pm l'erreur standard ou l'écart type de cette moyenne. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'analyse de la variance des moyennes avec le test ANOVA one-way, pour évaluer la signification de l'effet au seuil $P < 0.05$ par rapport à la plus petite différence significative avec les tests Fisher's (LSD). L'analyse en composante principale (ACP) a également été utilisée pour la discrimination de différents sites d'échantillonnage et la séparation des différents échantillons prélevés selon la composition de leurs pellicules et pépins en divers composés phénoliques.

Nous avons utilisé les logiciels STATISTICA 5.0 et XLSTAT 2014 pour l'évaluation des corrélations entre les paramètres étudiés et des tendances de leurs évolutions ainsi que pour la réalisation de l'ACP.

Chapitre III.
Résultats & Discussion

CHAPITRE III. RESULTATS & DISCUSSION

Dans cette étude, un grand nombre de facteurs est étudié et il est assez difficile de déterminer l'effet précis de chacun d'eux. De plus, la qualité du raisin est elle même difficile à définir, car même si de nombreux paramètres analytiques permettent de juger la qualité d'un fruit, la dégustation reste à ce jour l'étape déterminante.

1. Etude des composantes agro-pédologiques des différents sites

1.1 Interprétation du pH et de la conductivité électrique (CE) du sol

Le pH du sol indique l'acidité d'une solution du sol, il est considéré comme étant une analyse de routine standard. Le pH du sol affecte la solubilité et la disponibilité d'un grand nombre d'éléments minéraux, ainsi que l'activité microbienne. Le pH cible, qui représente la valeur de pH du sol associée à une croissance optimale de la plante, varie selon les espèces de cultures et peut être influencée par le type et la nature de sols. En général, un pH de 6,0 à 7,0 est idéal pour la plupart des cultures (**Ziadi et Sen Tran, 2006**). Le pH des sols a été également mesuré dans une solution de KCl à 1M ; grâce à cette solution, les cations adsorbés (H^+ et Al^{3+} inclus) sont échangés contre les ions K^+ , ce qui induit un pH plus bas dans la suspension. Cependant, cette valeur correspond d'une manière générale mieux au pH du sol dans un champ donné. Les valeurs du pH_{KCl} obtenu dans la présente étude ($6.81 \pm 0.30 - 7.46 \pm 0.16$) sont inférieures à celles du pH_{eau} ($7.57 \pm 0.13 - 7.83 \pm 0.64$). Ces deux déterminations conjointes (pH_{eau} et pH_{KCl}) sont d'un grand intérêt pour la majorité des sols hormis les sols neutres et surtout carbonatés, puisque $\Delta pH = pH_{eau} - pH_{KCl}$ révèle l'acidité potentielle ou l'acidité d'échange.

Tableau VI. Echelle d'interprétation du pH (site : <http://www.lano.asso.fr>).

pH_{eau} (1/5)	Appréciation agronomique
$pH \leq 5.5$	Sol très acide
$5.5 < pH \leq 6.0$	Sol acide
$6.0 < pH \leq 6.5$	Sol peu acide
$6.5 < pH \leq 7.0$	Sol neutre
$7.0 < pH \leq 7.5$	Sol peu alcalin (peu basique)
$pH > 7.5$	Sol alcalin (basique)

Tableau VII. Echelle d'interprétation de la CE (Carrier, 2003)

CE (mS/cm) (1/5)	Niveau de salinité
0 – 0.75	Très faible
0.75 – 1.50	Faible
1.50 – 2.25	Moyenne
2.25 – 3.50	Forte
3.50 – 5.00	Très forte
> 5.00	Excessivement forte

1.2 Interprétation de la densité réelle, apparente et la porosité

- D'après le CRAAQ (2005), la « densité réelle » d'un sol est le poids réel de la matière constitutive de ce sol, abstraction faite de la porosité. Elle se situe entre 2.2 et 2.7 g/cm³. Les résultats obtenus dans notre travail, sur les sols étudiés varient entre 1.98±0.16 et 2.18±0.05 g/cm³.
- La densité apparente d'un sol, correspond à son poids par unité de volume du sol sec en place. Elle est l'un des paramètres les plus importants dans les études portant sur la structure du sol. Elle est liée à la nature et à l'organisation des constituants du sol. Elle permet en outre, de calculer la porosité et d'apprécier ainsi indirectement la perméabilité, la résistance à la pénétration des racines et la réserve en eau du sol (Yoro et Godo, 1990). Les résultats du présent travail, ne présentant pas de différences significatives, varient entre 1.50 ± 0.23 et 1.93 ± 0.03 g/cm³.
- La connaissance des densités réelle et apparente nous permet de calculer la porosité des sols.

Tableau VIII : Echelle d'interprétation du pourcentage de la porosité des sols (Cadet, 2005)

Porosité (%)	Appréciation agronomique
2% < Porosité < 5%	Sol peu poreux
5% < Porosité < 15%	Sol moyennement poreux
15% < Porosité < 40%	Sol poreux
Porosité > 40%	Sol très poreux

1.3 Interprétation de la teneur en matière organique et du rapport C/N

La matière organique joue un rôle important dans les fonctionnements physiques, chimiques et biologiques du sol. Elle améliore la cohérence des éléments structuraux, favorise la rétention en eau utile, participe au stockage réversible des éléments nutritionnels, limite le développement de certains parasites, augmente l'aération du sol... Un sol bien pourvu en matière organique offrira un milieu bien plus favorable au développement des cultures et moins sensible aux aléas climatiques (site : <http://www.lano.asso.fr>).

L'azote est un des éléments qui influence le plus la vigueur de la vigne et la coloration du feuillage. Un excès entraîne une vigueur excessive et une sensibilité accrue à la pourriture et au dessèchement de la rafle. Les teneurs en azote des sols varient de 0.2‰ à 2.5‰ (Mengel et Kirkby, 1982 in Cadet, 2005).

Tableau IX : Echelle d'interprétation du taux de la matière organique selon la teneur en argile en viticulture (site : <http://www.lano.asso.fr>).

Teneur en matière organique (MO) (%)		Interprétation
MO < 1.4 %		Sol très pauvre en MO
1.4 % ≤ MO < 2.0 %		Sol pauvre en MO
2.0 % ≤ MO < 3.0 %	Argile < 22 %	Sol bien pourvu en MO
	22 % < Argile < 30% (ou teneur en argile inconnue)	Sol moyennement pourvu en MO
3.0 % ≤ MO < 4.0 %		Sol bien pourvu en MO
MO ≥ 4.0 %		Teneur élevée en MO

Le rapport C/N est un bon indicateur de l'activité biologique du sol (Crespy, 2003 in Cadet, 2005), plus le rapport C/N est élevé, moins l'azote est rapidement disponible.

Tableau X: Echelle d'interprétation du C/N des résidus organiques, la minéralisation et la disponibilité de l'azote pour les plantes

C/N	Niveau de minéralisation	Disponibilité de l'azote
< 10	Forte minéralisation	Elevée à très élevée
10 - 20	Bonne minéralisation	Bonne à élevée
20 - 60	Faible minéralisation	Faible à négative
60 – 100	Faible immobilisation	Faible à très négative
> 100	Forte immobilisation	négative

1.4 Interprétation du calcaire total et actif

Au-delà d'une teneur de 5% du calcaire total, les réserves naturelles de calcium et leur libération progressive, par dissolution sous l'effet des précipitations et de l'activité chimique et biologique du sol, rend inutile tout retour au chaulage sur le très long terme. Les sols sont systématiquement basiques (sauf très rares exceptions sur calcaires très durs et peu solubles). Dans ce cas, on a recours au dosage du calcaire actif, qui est la fraction du calcaire total susceptible de se dissoudre facilement et rapidement dans la solution du sol.

Tableau XI: Echelle d'interprétation des teneurs en calcaire total des sols (site : <http://www.lano.asso.fr>).

Teneur en calcaire total (% CaCO ₃)	Appréciation agronomique
CaCO ₃ Total ≤ 5%	Sol non calcaire
5 < CaCO ₃ Total ≤ 12.5%	Sol faiblement calcaire
12.5 < CaCO ₃ Total ≤ 25%	Sol modérément calcaire
25 < CaCO ₃ Total ≤ 50%	Sol fortement calcaire
CaCO ₃ Total > 50%	Sol très fortement calcaire

La présence de calcaire actif peut induire, dans certains sols pauvres en fer libre, un risque de chlorose ferrique, auquel certaines cultures sont sensibles. Les taux du CaCO₃ actif enregistrés varient de manière significative ($p < 0.05$) d'un site à l'autre entre 1.00 ± 0.00 et 3.19 ± 0.08 %, valeurs qui n'induisent pas le phénomène de chlorose qui est significatif pour une teneur en CaCO₃ actif de 6% et devient très important au-delà d'une teneur de 10%. Le calcaire actif conditionne le choix du porte-greffe. Selon l'**ITAF (1993)**, les ports greffes peuvent être choisis selon leur résistance au calcaire actif, à savoir :

- Calcaire actif < 17 %: 99 R, SO4, 1103 P, 11 OR
- Calcaire actif < 25 % : 140 Rg
- Calcaire actif < 40 % : 41 B

Dans la présente étude, le taux du CaCO₃ actif trouvé est inférieur à 6% et les porte-greffes sont de type SO4, ce qui protège les vignes contre le phénomène de chlorose.

1.5 Interprétation de l'analyse granulométrique

La granulométrie est une caractéristique héritée de l'histoire géologique et pédologique de la parcelle. Elle ne peut être modifiée par l'homme en situation culturale normale. La classe texturale de l'échantillon analysé y est déterminée en fonction du positionnement des valeurs

en argiles, sables et limons totaux, le point d'intersection des trois droites correspondantes aux trois classe détermine alors la classe texturale (voir le triangle texturale en Annexe n°1). De plus et en fonction de la teneur en argile, le sol est dit lourd ($A > 30\%$), moyen ($15 < A < 25$) ou léger ($A < 10\%$) (Spring *et al.*, 2003 in Cadet, 2005).

Tableau XII : Composition granulométrique des sols et texture correspondante

	Argiles (%)	Limons (grossiers et fins) (%)	Sables (grossiers et fins) (%)	Texture
Site 1	4	51.75	44.25	Limono-sableuse
Site 2	2	59.1	38.9	Limono-sableuse
Site 3	6	44.9	44.9	Limono-sablo-argileuse
Site 4	4	46.7	49.4	Limono-sableuse

Les résultats d'analyses physico-chimiques des sols sont représentés dans le tableau XIII

Tableau XIII : Caractéristiques physico-chimiques des sols des différentes parcelles étudiées

Caractéristiques/Sites	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
pH _{eau}	7.70 ± 0.46 ^a	7.83 ± 0.64 ^a	7.77 ± 0.55 ^a	7.57 ± 0.13 ^a
pH _{KCl}	7.26 ± 0.13 ^a	7.35 ± 0.13 ^a	7.46 ± 0.16 ^a	6.81 ± 0.30 ^a
Conductivité électrique (mS/cm à 25 °C)	1.25 ± 0.07 ^c	0.45 ± 0.07 ^a	0.65 ± 0.07 ^{a,b}	0.95 ± 0.21 ^{b,c}
Humidité (%)	5.5 ± 1.57 ^a	4.2 ± 0.6 ^a	3.0 ± 0.16 ^a	2.0 ± 0.00 ^a
Densité apparente (g/cm ³)	1.93 ± 0.03 ^a	1.85 ± 0.24 ^a	1.50 ± 0.23 ^a	1.65 ± 0.2 ^a
Densité réelle (g/cm ³)	2.15 ± 0.01 ^a	2.08 ± 0.10 ^a	2.18 ± 0.05 ^a	1.98 ± 0.16 ^a
Porosité (%)	10.24 ± 0.73 ^a	18.40 ± 4.90 ^a	30.91 ± 11.96 ^b	16.58 ± 3.16 ^a
Carbone (%)	2.17 ± 0.45 ^a	1.35 ± 0.43 ^a	1.45 ± 0.21 ^a	2.44 ± 0.11 ^a
Matière organique (%)	3.74 ± 0.78 ^a	2.33 ± 0.75 ^a	2.50 ± 0.37 ^a	4.22 ± 0.18 ^a
Calcaire total (%)	20.97 ± 0.04 ^a	21.37 ± 0.38 ^b	22.10 ± 0.07 ^b	20.94 ± 0.01 ^a
Calcaire actif (%)	1.44 ± 0.08 ^c	1.25 ± 0.00 ^b	3.19 ± 0.08 ^d	1.00 ± 0.00 ^a
Azote (%)	0.055 ± 0.003 ^b	0.060 ± 0.001 ^c	0.080 ± 0.000 ^d	0.021 ± 0.001 ^a
Nitrites (NO ₂ ⁻) (mg/kg du sol)	9.73 ± 1.04 ^{a,b}	8.43 ± 0.92 ^a	10.86 ± 0.43 ^{b,c}	12.20 ± 0.86 ^c
Ammonium (NH ₄ ⁺) (mg/kg N)	0.8 ± 0.00 ^a	1.99 ± 0.01 ^b	0.93 ± 0.12 ^a	2.40 ± 0.17 ^c
Chlorures (Cl-) (g/kg du sol)	3.32 ± 0.94 ^a	7.31 ± 0.94 ^b	3.32 ± 0.94 ^a	7.89 ± 1.88 ^b
Texture	Limono-sableuse	Limono-sableuse	Limono-sablo-argileuse	Limono-sableuse
Carbonates (CO ₃ ⁻) (g/kg du sol)	/	/	/	/
Hydrogénocarbonates (HCO ₃ ⁻) (g/kg du sol)	0.47 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.02 ^a

Des lettres différentes indiquent qu'il y a des différences à $p < 0.05$

En résumé :

Sites	Caractéristiques
Site 1	<ul style="list-style-type: none"> - Texture : limono-sableuse ; - Sol léger ($A < 10\%$) ; - pH alcalin, permettant une bonne biodisponibilité des éléments minéraux avec une faible salinité ; - Sol modérément calcaire : $12.5 < \text{calcaire total} \leq 25\%$; - Porte-greffe bien adapté : Calcaire actif $< 6\%$; - Sol bien pourvu en MO : $3.0\% \leq \text{MO} < 4.0\%$; - C/N = 39.45: faible minéralisation d'azote; - Disponibilité de l'azote est faible à négative; - Sol peu poreux (porosité 10.24%).
Site 2	<ul style="list-style-type: none"> - Texture : limono-sableuse ; - Sol léger ($A < 10\%$) ; - pH alcalin, permettant une bonne biodisponibilité des éléments minéraux avec une très faible salinité ; - Sol modérément calcaire : $12.5 < \text{calcaire total} \leq 25\%$; - Porte-greffe bien adapté : Calcaire actif $< 6\%$; - Sol bien pourvu en MO : $2.0\% \leq \text{MO} < 3.0\%$ (Argile $< 22\%$); - C/N=22.50: faible minéralisation d'azote ; - Disponibilité de l'azote est faible à négative; - Sol poreux (porosité 18.40%)
Site 3	<ul style="list-style-type: none"> - Texture : Limono-sablo-argileuse ; - Sol léger ($A < 10\%$) ; - pH alcalin, permettant une bonne biodisponibilité des éléments minéraux avec une très faible salinité ; - Sol modérément calcaire : $12.5 < \text{calcaire total} \leq 25\%$; - Porte-greffe bien adapté : Calcaire actif $< 6\%$; - Sol bien pourvu en MO : $2.0\% \leq \text{MO} < 3.0\%$ (Argile $< 22\%$); - Teneur en azote moyenne (bonne biodisponibilité) ; - C/N=18.13: Bonne minéralisation d'azote, activité biologique correcte, forte présence d'humus ; - Disponibilité de l'azote est bonne à élevée ; - Sol poreux (porosité 30.91%)
Site 4	<ul style="list-style-type: none"> - Texture : limono-sableuse ; - Sol léger ($A < 10\%$) ; - pH alcalin, permettant une bonne biodisponibilité des éléments minéraux avec une faible salinité ; - Sol modérément calcaire : $12,5 < \text{calcaire total} \leq 25\%$; - Porte-greffe bien adapté : Calcaire actif $< 6\%$; - Teneur élevée en MO: $\text{MO} \geq 40\%$; - C/N=116,19: forte immobilisation d'azote, activité biologique faible ; - Disponibilité de l'azote est négative ; - Sol poreux (porosité 16.58%)

2. Propriétés physico-chimiques des jus des raisins analysés

Les résultats des caractéristiques physico-chimiques des différentes variétés de raisins analysées sont récapitulés dans le tableau XIV (moyenne \pm écart type).

2.1 pH et acidité

Les valeurs du pH et de l'acidité des jus de raisin étudiés présentent des différences significatives, excepté Muscat blanc, Gros noir, Cardinal 1 et 2 pour leur acidité. Le pH des différents jus analysés varie entre 3.50 ± 0.001 (Muscat noir) et 3.81 ± 0.01 (Cardinal), soit pour une acidité variant entre 0.217 ± 0.01 % (Victoria) et 0.518 ± 0.02 % (Muscat noir), cette dernière variété a montré le pH le plus faible et par conséquent l'acidité la plus élevée ce qui explique les caractéristiques gustatives spécifiques du Muscat noir. Ces résultats sont en conformité avec les résultats obtenus sur les jus de raisin analysés par **Burin et al. (2008)**, (pH 3.30 – 3.64 ; acidité 6.44 ± 0.08 - 8.20 ± 0.09 g d'acide tartrique/l).

2.2 Degré Brix et densité

Le total des solides solubles ou le °Brix des différents jus analysés varie de manière significative et oscille entre 17.05 ± 0.07 % (Gros noir) et 21.01 ± 0.01 % (Muscat noir), avec une densité qui varie, quant à elle, entre 1.062 et 1.087 pour respectivement les mêmes variétés. Les valeurs du °Brix s'élèvent avec l'augmentation de la densité. L'étude statistique a montré l'existence d'une corrélation positive importante entre les deux paramètres ($r = 0.71$).

Selon le **CODEX STAN 247 (2005)**, la valeur minimale du °Brix pour les jus de raisin est de 16%, tous les jus analysés dans cette étude présentent des valeurs supérieures à 16%, ce qui indique que tous les échantillons sont en accord avec la législation, ils représentent une bonne source nutritive en sucres. Le Muscat noir a montré la teneur la plus élevée du °Brix ($21.01\% \pm 0.01$) ce qui lui confère un goût relativement doux en comparaison avec d'autres jus de raisin de table de la Californie (USA) analysés par **Yi et al. (1997)** qui se situent entre 17 et 19 %.

La variation des caractéristiques physico-chimiques des variétés de raisin peut être attribuée aux différences génétiques et physiologiques (**Del Caro et al., 2004**), aux traitements de fertilisation (**Dou et al., 2005**). Selon **Kim et al. (2013)**, la composition chimique (total des solides solubles, sucres, acides organiques) des cultivars de fraisiers varie considérablement suivant le génotype et le stade de maturité du fruit.

Tableau XIV: Propriétés physico-chimiques des jus de raisin

		pH	° Brix (%) (TSS)	Acidité (%)	°Brix /Acidité	Densité (20°C)
Site 1	-Cardinal	3.81 ± 0.01 ^f	17.65 ± 0.07 ^{b,c}	0.406 ± 0.00 ^b	43.47 ± 0.17 ^a	1.077
Site 2	-Cardinal	3.58 ± 0.01 ^c	17.30 ± 0.14 ^{a,b}	0.448 ± 0.04 ^b	38.78 ± 3.74 ^a	1.074
	-Gros noir	3.64 ± 0.01 ^d	17.05 ± 0.07 ^a	0.420 ± 0.02 ^b	40.52 ± 1.91 ^a	1.062
Site 3	-Muscat	3.39 ± 0.01 ^a	17.75 ± 0.35 ^c	0.413 ± 0.01 ^b	42.98 ± 0.17 ^a	1.073
	blanc	3.50 ± 0.001 ^b	21.01 ± 0.01 ^d	0.518 ± 0.02 ^c	40.57 ± 1.55 ^a	1.087
	-Muscat noir					
Site 4	-Victoria	3.74 ± 0.01 ^e	17.85 ± 0.07 ^c	0.217 ± 0.01 ^a	82.34 ± 33.3 4 ^b	1.076

Les raisins ont été pressés ; les paramètres pH, °Brix, acidité, densité ont été analysés le lendemain
 Les valeurs portant la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas significativement à $p < 0.05$.
 Les résultats sont classés par ordre croissant; $a < b < c < d < e < f$.

Le rapport sucres/acidité constitue un indicateur de maturité commerciale et de consommation. Au début du processus de maturation, le rapport sucres/acidité est bas, en raison d'un contenu en sucres bas et d'un contenu en acides élevé, ce qui rend le fruit aigre. Durant le processus de maturation, les acides sont dégradés, le contenu en sucres augmente et le rapport sucres/acidité prend une valeur plus élevée. On considère que des valeurs comprises entre 35 et 50 représentent une excellente qualité de vendange. Selon ce critère, toutes les variétés de raisins analysées dans la présente étude sont mûres. Des valeurs supérieures à 50 correspondent à des millésimes « exceptionnels » c'est le cas de la variété Victoria (82.34 ± 3.34) (Dupuch, 1998).

3. Antioxydants des raisins frais

3.1 Acide ascorbique

Le raisin est connu pour être une source nutritive de la vitamine C dans l'apport alimentaire. La teneur en acide ascorbique des différents échantillons varie entre 12.33 ± 0.01 (Victoria) et 30.80 ± 4.98 mg/100 ml (Gros noir) (tableau XV). Les résultats enregistrés ne présentent pas de différences significatives à $p < 0.05$. La teneur en acide ascorbique enregistrée pour le jus de pamplemousse fluctue entre 27.7 et 40.0 mg/100 ml (Dou *et al.*, 2005) ; cependant selon les travaux de Dani *et al.* (2007), la teneur en vitamine C varie de 4.4 à 57.2 mg /100 ml pour tous les jus de raisins cultivés en conditions conventionnelles et organiques des variétés Niagara (blanc) et Bordo (pourpre).

La variabilité des teneurs en acide ascorbique des raisins est affectée par plusieurs facteurs, Lee et Kader (2000) et Kader (2002) ont rapporté que les facteurs pré-récolte y compris les

conditions climatiques notamment l'exposition au soleil, les pratiques culturales, la maturité à la récolte, la méthode de récolte, les conditions de manipulation post-récolte (stockage), les espèces, les cultivars, les tissus, ainsi que le génotype (Sharique et Beigh, 2009), la fertilisation (Dou *et al.*, 2005) et la salinité (Navarro *et al.*, 2006), tous ces facteurs sont responsables de la grande variation de la teneur en vitamine C des fruits et légumes.

Tableau XV: Teneurs en acide ascorbique et en caroténoïdes totaux des différentes variétés de raisin analysés

		Acide ascorbique (mg /100ml)	Caroténoïdes totaux (µg/g)*
Site 1	-Cardinal	22,44 ± 0,62 ^a	08,72 ± 0,20 ^b
Site 2	-Cardinal	13,20 ± 3,73 ^a	13,61 ± 0,07 ^c
	-Gros noir	30,80 ± 4,98 ^a	14,93 ± 0,03 ^d
Site 3	-Muscat blanc	14,08 ± 2,49 ^a	14,70 ± 0,11 ^d
	-Muscat noir	26,84 ± 5,60 ^a	16,11 ± 0,34 ^e
Site 4	-Victoria	12,33 ± 0,01 ^a	05,99 ± 0,12 ^a

*Exprimé en µg/g du poids frais

Les valeurs portant la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas significativement à $p < 0.05$.

Les résultats sont classés par ordre croissant; $a < b < c < d$.

3.2 Caroténoïdes totaux

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques tels que l'acétone, le chloroforme, etc... Dans la présente étude, deux phases ont été utilisées, une phase apolaire qui permet de récupérer les caroténoïdes et une phase polaire pour éliminer les molécules hydrophiles tels que les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes.

Les teneurs en caroténoïdes des échantillons analysés présentent des différences significatives ($p < 0.05$). Vu les résultats obtenus (tableau XV), des quantités importantes de caroténoïdes ont été détectées et cela pour les raisins rouges et blancs ; les teneurs sont comprises entre 5.99 ± 0.12 (Victoria) et 16.11 ± 0.34 µg/g (Muscat noir). Comme les conditions climatiques étaient uniformes pour tous les cultivars, cette tendance pourrait être due à des différences dans les variétés et les conditions viticoles notamment les caractéristiques du sol en particulier la texture, car d'après les résultats obtenus tous les sites présentent la même texture (limono-sableuse) à l'exception du site 3 (limono-sablo-argileuse), donc une capacité de rétention d'eau plus élevée menant ainsi à une teneur en caroténoïdes élevée. L'étude entreprise par Oliveira *et al.* (2003), sur deux sols, un sol A ayant une meilleure capacité de rétention d'eau que le sol B. Les deux sols ont été traités avec et sans irrigation. Comme prévu, les raisins non

irrigués avaient un poids inférieur à la récolte, et le traitement avec irrigation a contribué à faire progresser le taux de sucres pour les deux sols. Le taux de caroténoïdes n'a pas été affecté par le type de sol. La concentration en caroténoïdes des fruits cultivés dans le sol A n'a pas varié en fonction des pratiques d'irrigation, mais s'est avérée 60 % inférieure dans les fruits irrigués cultivés dans le sol B, ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans le présent travail, où les variétés de raisin du site 3 présentent des teneurs élevées en caroténoïdes (Muscat blanc $14.70 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ et Muscat noir $16.11 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$) en comparaison avec la variété Victoria (05.99 ± 0.12) irriguée et cultivée dans un sol à capacité de rétention d'eau faible, par rapport au sol du site 3, qui présente des baies plus grandes et riches en sucres mais avec une teneur en caroténoïdes plus faible.

La salinité du sol, est un paramètre intervenant également dans l'évolution de la teneur en caroténoïdes totaux ; celle-ci diminue avec l'augmentation de la salinité, ceci peut s'expliquer par le fait que le stress salin mène à la dégradation des caroténoïdes qui protègent les chloroplastes (où ils sont synthétisés et localisés) de la photo-oxydation, En outre, ils agissent aussi en tant que pigments qui absorbent l'énergie lumineuse dans la gamme de 400 à 500 nm (bleu), qui n'est pas accessible par les chlorophylles et transmettent cette énergie d'excitation aux molécules de la chlorophylle, ce qui réduit l'activité photosynthétique (**Mane et al., 2011 ; Reza-Amirjani, 2011**). Dans la présente étude, une corrélation négative a été trouvée entre la CE (qui traduit la salinité du sol) et les teneurs en caroténoïdes totaux avec $r^2 = 0.60$ (Fig.31a).

En outre, l'augmentation du taux de calcaire du sol a augmenté progressivement la teneur en caroténoïdes des raisins ; ces deux paramètres sont bien corrélés avec $r^2 = 0.68$ (Fig. 31b). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Habba et al. (2013)** qui ont mentionné que le sol gypseux a amélioré le contenu des pigments chez l'arbre *Khaya sengalensis*.

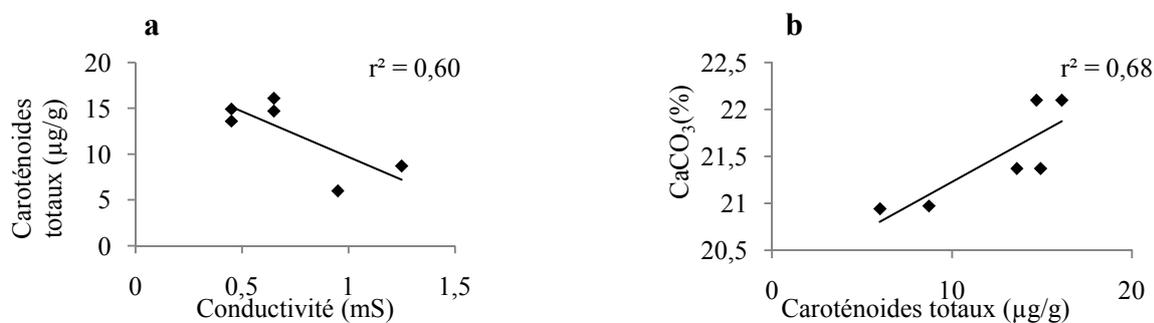


Figure 31. Relation linéaire entre les caroténoïdes totaux et la CE (a) ; les caroténoïdes totaux et le calcaire total (b)

Il y a peu d'études relatives à la composition en caroténoïdes des raisins. Les résultats enregistrés dans cette étude n'étaient pas en accord avec les données de la littérature. **Crupi et al. (2010)** ont étudié les caroténoïdes de quelques variétés de raisin de cuve et ont obtenu des valeurs allant de 720 à 2052 µg/kg. Une autre étude sur 8 variétés de raisins de cuve de la région de Douro (Portugal) a rapporté des valeurs variant entre 386 – 1954 µg/kg (**Oliveira et al., 2006**). Dans leurs travaux sur 3 variétés de raisin italien (Erbaluce, Barbera and Nebbiolo), **Giovanelli et Brenna. (2007)** ont trouvé des teneurs respectives de 1.1, 9.1 et 4 µg/g de poids sec, des valeurs qui se rapprochent de celles obtenues pour le Cardinal 1 (08.72 ± 0.20) et Victoria (5.99 ± 0.12). Les travaux de **Bunea et al. (2012)** sur 9 variétés de raisin de table et de cuve ont montré que les cépages blancs ont une teneur plus élevée en caroténoïdes par rapport aux cultivars bleu-noir. Cependant, dans leur étude sur la pellicule de 3 variétés de raisin (blanc, rouge et noir), **Lancster et al. (1997)** ont rapporté des concentrations de 0.005 mg/g du poids frais pour les 3 variétés.

Les différences des teneurs en caroténoïdes par rapport à celles obtenues dans la présente étude, sont probablement dues à la technique d'extraction et/ou à la sensibilité de la méthode de dosage, à des différences variétales et à l'origine géographique des échantillons analysés.

3.3 Composés phénoliques

3.3.1 Polyphénols totaux (PPT)

La teneur en PPT des différents échantillons étudiés est montrée dans la figure 32 ; cette teneur, exprimée en gramme du poids frais, varie entre 1.21 ± 0.04 mg EAG (Cardinal 1) et 3.35 ± 0.21 mg EAG (Gros noir). Les concentrations en PPT des autres cépages ont été les suivantes : Muscat noir (3.04 ± 0.06 mg EAG), Cardinal 2 (1.85 ± 0.04 mg EAG), Victoria (1.82 ± 0.13 mg EAG) et Muscat blanc (1.58 ± 0.11 mg EGA). Ces résultats sont significativement différents à $p < 0.05$ exceptés pour les variétés Muscat blanc, Victoria et Cardinal 2.

En se basant sur ces résultats, les cinq cépages étudiés peuvent être classés en deux groupes, l'un présentant un taux en PPT clairement élevé (raisins teinturiers Gros noir et Muscat noir), qui est due probablement à l'accumulation maximale des anthocyanes et de flavonols qui augmente au cours de la dernière étape de maturation contribuant ainsi à une teneur en polyphénols élevée (**Marinova et al., 2005**) ; l'autre groupe ayant une teneur plus faible (Victoria, Muscat blanc, Cardinal 1 et Cardinal 2), ces résultats sont en agrément avec ceux

de **Dani et al. (2007)** qui ont rapporté un taux en PPT supérieur dans les jus de raisin rouge de *Vitis labrusca* que les blancs.

La teneur en PPT du Gros noir et Muscat noir était respectivement d'environ 2.8 et 2.5 fois plus élevée que celle du Cardinal 1. Notre observation est inférieure de 3.6 fois la différence entre les concentrations les plus faibles et les plus élevés du raisin blanc rapporté par **Breska et al. (2010)**.

Une teneur élevée en PPT du raisin pourrait contribuer à une meilleure activité antioxydante. En fait, il avait été signalé que l'activité antioxydante de matières végétales est bien corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Barros et al., 2007**). **Mulero et al. (2010)** ont trouvé dans leur étude sur le cépage Monastrell, une concentration en PPT de 982.0 ± 58.97 mg/kg de poids frais ; **Marinova et al. (2005)** ont trouvé des teneurs respectives de 184.1 et 213.3 mg/100g du poids frais de raisin blanc et noir (*Vitis Vinifera*), qui sont plus faibles que nos résultats. Cependant, **Ivanova et al. (2010)** dans leurs travaux sur 4 cépages (Vranec, Cabernet sauvignon, Muscat de hambourg et Riesling) ont trouvé des valeurs respectives de 216.98, 146.15, 173.74 et 311 mg/l (du poids frais). Selon **Yang et al. (2009)**, la teneur en PPT a varié entre 201.1 et 424.6 mg EAG/100g (du poids frais) de 14 variétés de raisins, teneurs élevées par rapport aux résultats de la présente étude. Selon **Orak (2007)** et **Du et al. (2012)**, plusieurs facteurs tels que la variété, les différences génétiques entre les différents cultivars ainsi que l'origine géographique (**Stefanovits-Bányai et al., 2003**), le stade de développement (**Prvulović et al., 2011**), la composition du sol (**Imre et al., 2012**), le porte-greffe (**Jakobek et al., 2009**) et la méthode d'extraction notamment temps, température et solvant (**Bucić-Kojić et al., 2011**), pourraient influencer la teneur en composés phénoliques.

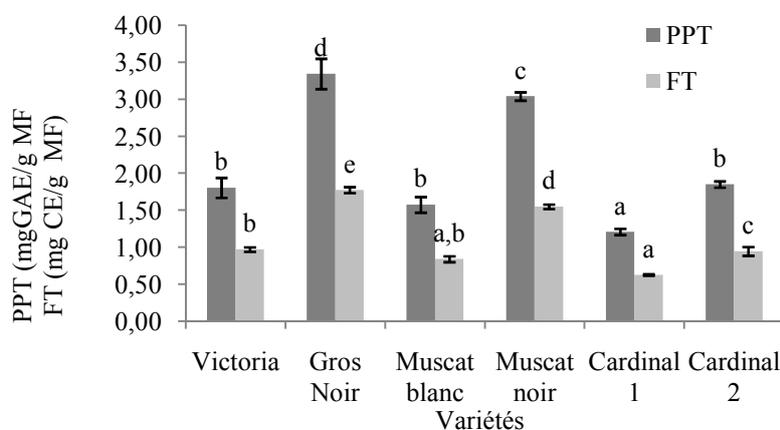


Figure 32. Teneurs en PPT et FT des différents cépages de raisins

Les données sont représentées comme une moyenne \pm écart-type (bars).

Les valeurs marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$)

Les teneurs en PPT et FT sont exprimées en mg EAG/g et mg EC/g de poids frais, respectivement.

3.3.2 Flavonoïdes totaux (FT)

La teneur en FT par gramme des échantillons analysés varie entre 0.40 ± 0.01 mg EC et 1.09 ± 0.04 mg EC du poids frais (Fig. 32). Le Gros noir a montré la teneur la plus élevée de 1.09 ± 0.04 mg EC/g, celle-ci est suivie par le Muscat noir (0.84 ± 0.03 mg EC), Victoria (0.46 ± 0.03 mg CE), Cardinal 2 (0.46 ± 0.06 mg CE), Muscat blanc (0.45 ± 0.04 mg CE) et cardinal 1 (0.40 ± 0.01 mg CE). Les résultats obtenus sont significativement différents à $p < 0.05$ exceptés pour les variétés Muscat blanc, Victoria et Cardinal 1.

Marinova et al. (2005) ont trouvé des teneurs respectives de 36.5 et 77.1 mg/100g du poids frais de deux variétés de raisins blanc et noir (*Vitis Vinifera*); celles-ci se rapprochent ou sont légèrement inférieures à celles obtenues dans cette recherche. Dans cette étude, les teneurs en FT sont beaucoup plus faibles que les résultats de **Du et al. (2012)** (228.7 et 607.7 mg équivalent rutine/100g du poids frais de 8 différentes variétés de raisins) et ceux trouvés par **Yang et al. (2009)**. Ces différences dans les teneurs en flavonoïdes des raisins est fonction de leur origine génétique, des périodes de récolte et des différentes parties du fruit (**Lu et al., 2006**), de la variété, des pratiques agricoles ; de la méthode d'extraction et/ou de la sensibilité de la méthode de dosage (**Kim et al., 2003**) ainsi que de l'exposition à la lumière et à la température (**Makris et al., 2006**).

Les teneurs en PPT des raisins analysés varient dans le même sens que les teneurs en FT (Gros noir > Muscat noir > Cardinal2 > Victoria > Muscat blanc > cardinal1) donnant ainsi un coefficient de corrélation élevé ($r^2 = 0.937$) (Fig. 33) ; une relation similaire a été trouvée par **Kim et al. (2003)** avec $r^2 = 0.934$ dans son étude sur 6 cultivars de prunes.

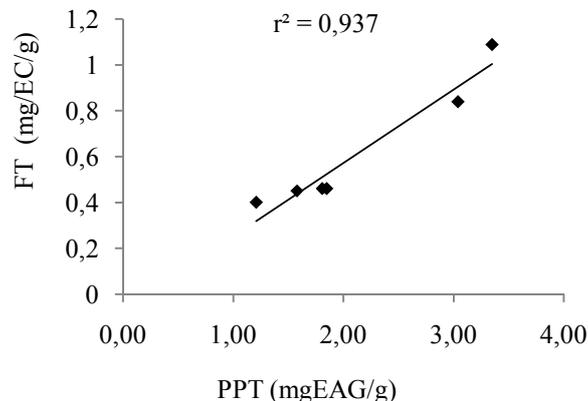


Figure 33. Corrélation entre la teneur en PPT et FT des extraits méthanoliques du raisin

3.3.3 Activité antioxydante (Pouvoir réducteur, PR)

Le PR est un test qui mesure la capacité des extraits à réduire le fer ferrique du ferrocyanure de potassium en fer ferreux. Les résultats de la mesure du PR des extraits des variétés analysées, exprimés en quantité d'antioxydants équivalents en acide ascorbique (EAA), sont représentés dans la figure 34. Le PR par gramme du poids frais varie entre 3.69 ± 0.13 mg (Cardinal1) et 16.58 ± 0.07 mg (Gros noir). Le PR du Muscat noir, Muscat blanc, Cardinal 2 et Victoria sont respectivement de 11.85 ± 0.36 , 9.19 ± 0.12 , 6.26 ± 0.09 et 5.04 ± 0.23 mg EAA. Les résultats obtenus présentent des différences significatives ($p < 0.05$), exceptés pour les variétés Victoria et Cardinal 2.

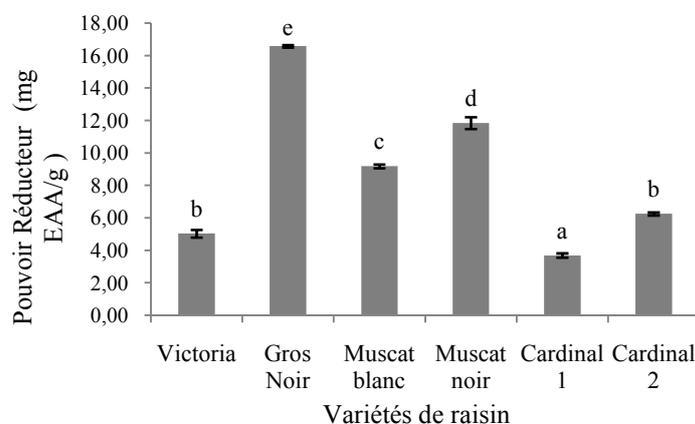


Figure 34. Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques du raisin

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm écart-type (bars).

Les valeurs marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$)

Les résultats sont exprimés en équivalent acide ascorbique (EAA mg/g du poids frais)

Les extraits méthanoliques du Gros noir, Muscat noir et Muscat blanc ont montré un PR élevé en comparaison avec Victoria, Cardinal 1 et 2 (Fig. 34) Il n'y avait pas de tendance claire en termes de capacité antioxydante (PR) et le contenu phénolique des cultivars de raisins blanc, rouge et noir. A titre d'exemple, le Muscat blanc (cépage blanc) a une faible teneur en PPT que le Cardinal 2 mais présente un PR élevé ; cela peut s'expliquer par le fait que le Muscat blanc a une teneur élevée en caroténoïdes qui contribuent à élever le PR. Les explications possibles des résultats mentionnés ci-dessus, d'après **Di Majo et al., (2008)**, pourraient être :

- L'influence des différents sous-groupes de flavonoïdes et non-flavonoïdes sur la capacité antioxydante. Divers composés phénoliques ont des réponses différentes en fonction du nombre de groupements OH et OCH₃ et leur position sur l'anneau ;

- Le degré de polymérisation et le rapport entre les formes monomériques et polymériques ; en effet, l'inhibition des radicaux libres a tendance à augmenter avec le DP_m ;
- La synergie ou l'antagonisme possible entre les différentes classes de polyphénols.

Dans ce cas, il n'est pas possible de généraliser la relation entre les cépages blancs et rouges comme un groupe en termes de capacité antioxydante, car cette activité est plus liée au cépage lui-même, ceci est en accord avec les résultats trouvés par **Gil et al. (2002)** sur 5 différents cultivars de nectarine à pulpe blanche et 5 à pulpe jaune provenant de la Californie.

Il a été rapporté que les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réductones, qui exercent une action antioxydante en déstabilisant la chaîne des radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène. En conséquence, les cépages avec un PR élevé peuvent contenir des quantités plus élevées de réductones, qui pourraient réagir avec les radicaux libres pour stabiliser et bloquer les réactions radicalaires en chaînes (**Barros et al., 2007**). Ainsi, l'activité antioxydante d'un extrait ne peut pas être déduite à partir de sa teneur en PPT.

Le PR des extraits méthanoliques de raisin présente de bonnes corrélations linéaires avec les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, en caroténoïdes et en vitamine C avec des coefficients de corrélations "r²" respectifs de 0.82, 0.88, 0.54 et 0.51 (Fig. 35). Une corrélation similaire entre PR et PPT a été trouvée par certains chercheurs, avec r² = 0.990 sur 6 cépages de raisin et 10 nouvelles sélections de raisin (**Breksa et al., 2010**); r² = 0.756 sur 16 cépages de raisin rouge (**Orak, 2007**); r² > 0.90 (**Gil et al., 2002**) sur certains fruits de nectarine, pêche et prune de Californie et r² = 0.938 (**Kim et al., 2003**). L'étude de **Dani et al. (2007)** sur différents jus de raisin rouge (*Vitis labrusca*) considérés comme une source d'antioxydant, a montré que l'activité biologique est influencée non seulement par les niveaux phénoliques, mais aussi par la méthode agricole utilisée.

Kim et al. (2003) ont constaté une bonne corrélation (r² = 0.942) entre FT et l'activité antioxydante de prunes et de pommes avec un niveau de signification élevé (P < 0.001). En outre, **Pinelo et al. (2004)** ont rapporté que l'activité antioxydante des flavonoïdes est en accord avec leur activité antiradicalaire.

Ces résultats impliquent que les polyphénols et les flavonoïdes peuvent jouer un rôle important dans l'activité de piégeage des radicaux libres (activité antioxydante) des extraits de raisin. Le PR est également corrélé avec les teneurs en caroténoïdes (r² = 0.541), et en

vitamine C ($r^2 = 0.514$), ce qui indique que ces composés contribuent également à l'activité antioxydante du raisin. Toutefois, **Gil et al. (2002)** n'ont pas trouvé de corrélation entre la vitamine C, les caroténoïdes avec l'activité antioxydante dans leur étude ; tandis que, **Rufino et al. (2010)** ont constaté dans leur travail sur 18 fruits tropicaux en provenance du Brésil, une corrélation positive entre la vitamine C et l'activité antioxydante (ABTS, $r = 0.70$ et FRAP, $r = 0.70$). Des résultats similaires ont été trouvés par **Iońska-Ryś et al. (2009)** sur les fruits de sept espèces sauvages de la région de Lublin (Pologne) (ABTS, $r^2 = 0.925$ et FRAP, $r^2 = 0.984$).

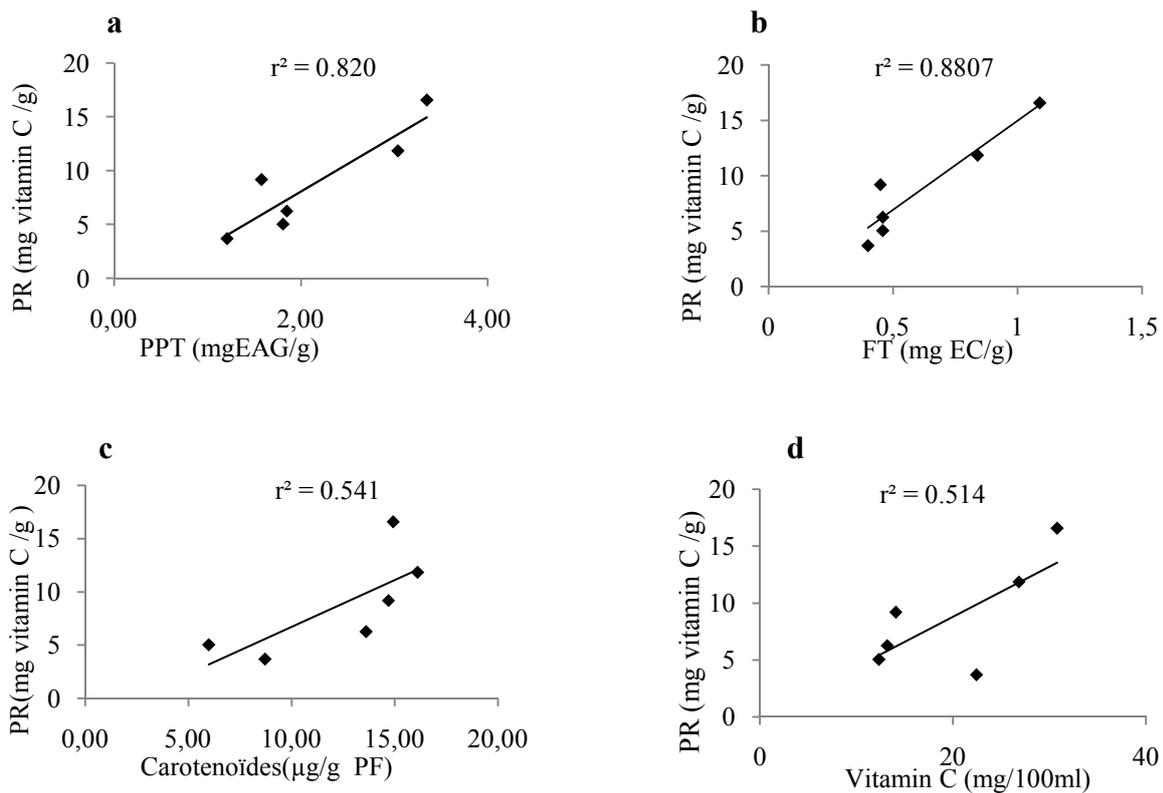


Figure 35. Corrélation entre PR et teneurs en PPT (a), FT (b), caroténoïdes (c) et vitamine C (d)

4. Antioxydants des pellicules et pépins

4.1 Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments qui colorent la pellicule des variétés rouges et noires et sont absents chez les cépages blancs. Les teneurs en anthocyanes totales libres (ATL) (non liées en tanins) en mg/kg de baies enregistrées, varient significativement ($p < 0.05$) de 12.15 ± 0.2 à 214.10 ± 1.7 (tableau XVI). Le Gros Noir a enregistré la teneur la plus élevée (214.10 ± 1.7 mg/kg de baie), ce résultat est la conséquence de la richesse et du degré de maturité de ce cépage.

Dans une analyse par chromatographie (HPLC), **Mattivi et al. (2006)** ont indiqué que la teneur en anthocyanes de 64 variétés italiennes de raisin rouge est comprise entre 25.58 et 6279.37 mg/kg du poids frais. Dans une autre étude, **Rockenbach et al. (2011)** ont trouvé que les teneurs en anthocyanes de six variétés de raisin rouge provenant de l'état de Santa Catarina (Brésil) varient entre 289.46 et 934.67 mg/100 g du poids sec. Alors que **Guerrero et al. (2009)**, ont obtenu sur 5 variétés de raisin rouge cultivées en Andalousie, des teneurs qui fluctuent entre 906 et 2640 mg/kg du poids frais. Ces valeurs sont supérieures à celles de la présente étude.

Les teneurs en ATL des variétés Cardinal 1 et 2 sont faibles par rapport aux deux autres variétés, ceci peut s'expliquer par la température enregistrée à la récolte de ces variétés qui était de 32.38°C. D'après **Spayd et al. (2002)**, la couleur des baies du Cardinal est beaucoup plus sensible aux températures élevées qu'à l'intensité lumineuse. Des températures journalières de 32 à 36 °C inhibent pratiquement la synthèse d'anthocyanes dans le Cardinal.

Selon **Adams (2006)**, **Mattivi et al. (2006)** et **Conde et al. (2007)**, le taux d'anthocyanes dépend non seulement des facteurs génétiques, mais aussi des facteurs agronomiques tels que la composition du sol, l'irrigation et les conditions climatiques de l'année de récolte. Les différences observées sont aussi probablement dues à des différences variétales, à l'origine géographique, au solvant et/ou aux techniques d'extraction et de dosage. De plus, l'effet du séchage que les pellicules des baies de raisin ont subi peut également influencer la teneur en anthocyanes. D'après **Marquez et al. (2013)**, le processus du séchage des fruits implique une situation de stress induisant des changements significatifs dans leur métabolisme de l'aérobie à l'anaérobie, ayant pour résultats l'activation de l'enzyme l'alcool déshydrogénase et d'autres enzymes qui peuvent mener à la formation des composés de condensation de l'anthocyane avec les favanols via le pont de méthylméthine (Fig. 36).

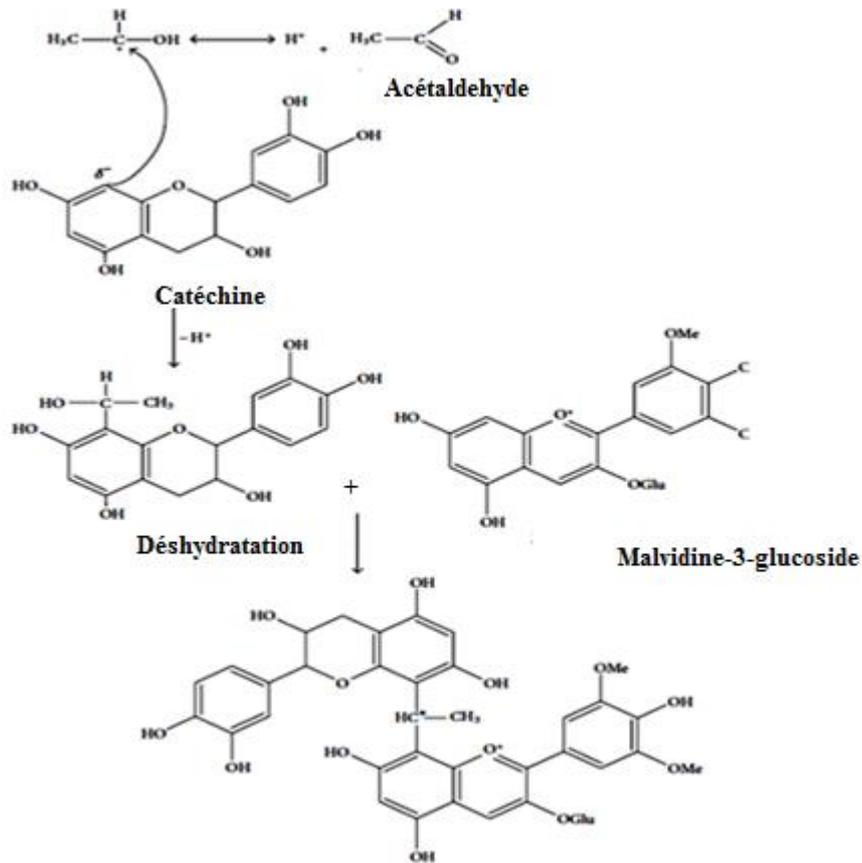


Figure 36. Formation de composés anthocyanine-méthylméthine-favanol par réaction entre la (+)-catéchine et de malvidine-3-glucoside (Marquez *et al.*, 2013)

En outre, d'après Spayd *et al.* (2002), les faibles teneurs en anthocyanes enregistrées dans cette étude semblent être dues également à une température élevée, par la dégradation ou l'inhibition de la synthèse, ou plus probablement les deux à la fois. Des températures élevées sont préjudiciables à l'accumulation des anthocyanes dans les pellicules, mais un certain degré de chaleur est nécessaire pour la synthèse. La température critique de l'accumulation des anthocyanes dans les pellicules des baies de Merlot peut se situer entre 30 et 35 °C.

En effet, comme l'hydroxylation du cycle B des anthocyanes est sous l'action des enzymes flavonoïde-3'-hydroxylase (F3'H) et des flavonoïdes 3,5'-hydroxylase (F3'5'H), la composition des anthocyanes des pellicules du raisin sera déterminée par les activités relatives de ces enzymes. En parallèle, la méthyle transférase (MT) détermine l'activité des différents modes de méthylation du cycle B et l'acyltransférase la présence de dérivés acylés. La plupart de ces enzymes contrôlent également la synthèse de flavonols (Hernández-Jiménez *et al.*, 2013).

Enfin, d'après **Downey et al. (2006)**, la synthèse et la concentration de phénols dans les raisins dépendent du cultivar, la maturité des fruits, les pratiques de gestion du vignoble, les conditions climatiques ainsi que les caractéristiques du sol.

Tableau XVI: Teneurs en différentes fractions d'anthocyanes détectées dans les extraits de pellicules

Cépages	ATL (mg/Kg de baies)	Anth. Acét (%)	Anth. Coumar (%)	Anth. Trisubst (%)*	Anth. Coum- acét(%)	Anth. non acylées (%)
Muscat B	0,00±0.00	0,00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000
Cardinal 1	12.15±0.2 ^a	1.08±0.000 ^{a,b}	7.02±0.003 ^a	26.39±0.005 ^a	8.14±0.002 ^a	91.86±0.002 ^c
Cardinal 2	17.40±0.4 ^b	1.29±0.004 ^b	10.68±0.008 ^b	34.24±0.003 ^b	11.98±0.004 ^b	88.02±0.004 ^b
Gros Noir	214.10±1.7 ^d	0,68±0.001 ^{a,b}	28.58±0.008 ^c	82.13±0.001 ^d	29.26±0.008 ^c	70.74±0.008 ^a
Muscat N	20.40±0.3 ^c	0.43±0.002 ^a	6.35±0.001 ^a	54.14±0.007 ^c	7.17±0.002 ^a	92.83±0.002 ^c
Victoria	0.00±0.00	0.00±0.000	0.00±0.000	0.00±0.000	0,00±0.000	0.00±0.000

**Exprime le rapport entre les anthocyanes disubstituées (cyanidine "Cn"– peonidine "Pn") et trisubstituées (malvidine "Mv", delphinidine "Dp" et pétunidine "Pt")*

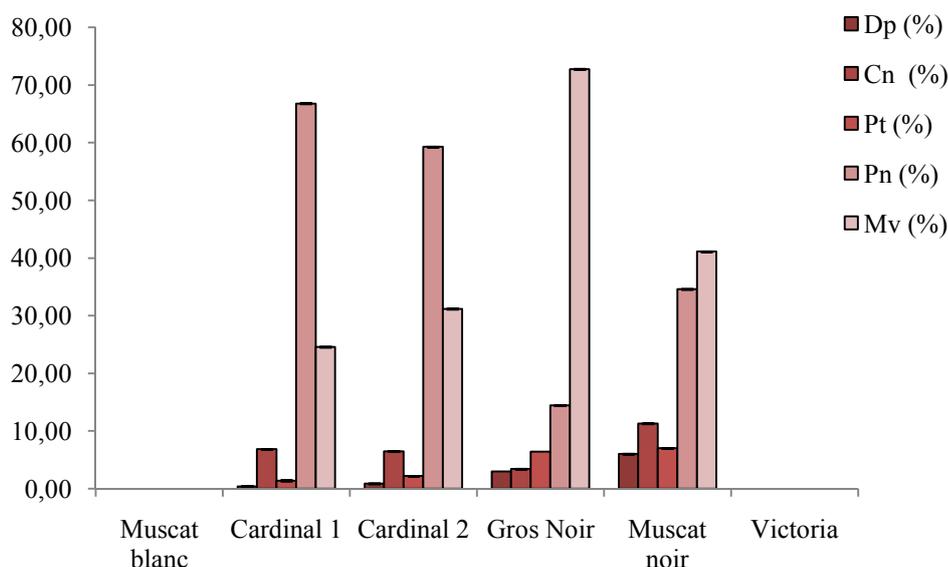


Figure 37. Teneurs en anthocyanes (%) des pellicules de différentes variétés de raisin analysées

**Pour l'identification des différentes anthocyanes, se référer à l'annexe n°3*

Les profils chromatographiques des anthocyanes des cinq cépages de raisins sont représentés dans la figure 38. Les résultats d'analyse chromatographique des anthocyanes (Fig. 37et 38) montrent que la Mv3glc est l'anthocyane dominante dans les cultivars Gros noir et Muscat noir avec respectivement 72.73 ± 0.002 et 41.11 ± 0.008 %, ce qui est en agrément avec la

perception générale que la Mv3glc est la principale anthocyane des raisins rouges (**Revilla et Ryan, 2000; Revilla et al., 2001**). Cependant, en accord avec les observations de **Brar et al. (2008)** et **Castillo-Munoz et al. (2009)**, la Pn3glu est l'anthocyane majeure des cépages Cardinal 1 et 2 avec respectivement 66.77 ± 0.005 et $59.27 \pm 0,000$ % des anthocyanes totales. Il a été rapporté que les taux de la cyanidine et de la péonidine sont plus élevés dans les cultivars de raisin rouge tandis que les teneurs en delphinidine et en malvidine sont plus élevées dans les raisins noirs (**Mizuno et al., 2006**). Nos données indiquent que la couleur des baies de raisin peut être liée à la concentration relative des Pn3glc et Mv3glc dans la pellicule.

D'après **Río Segade et al. (2009)**, la Pn3glc et la Mv3glc sont des molécules stables, ce sont les formes ultimes de la biosynthèse des anthocyanes. Le rapport entre les dérivés de la péonidine et de la malvidine pourrait être utilisé en tant que marqueurs de cépages. Cependant, les anthocyanes portant des groupes orthodiphénoliques (cyanidine, delphinidine, et pétunidine) présentent une sensibilité accrue à l'oxydation (**Hernández-Jiménez et al., 2013**)

Les anthocyanes non-acylées sont la principale classe des anthocyanes des raisins (>70%) pour les quatre cépages étudiés, le Muscat noir présente le taux d'anthocyanes non-acylés le plus élevé ($92.83 \pm 0.002\%$), suivi du Cardinal 1 ($91.86 \pm 0.002\%$), du Cardinal 2 ($88.02 \pm 0.004\%$) et enfin du Gros noir (70.74 ± 0.008 %) ; le même résultat a été trouvé par **Cook-Papini et al. (2010)** avec des pourcentages dépassant les 65% pour les trois variétés Albarossa, Barbera et Nebbiolo di Dronero de la région Piedmont (Italie) ; pour **Castillo-Munoz et al. (2009)**, les données sur la variété espagnole Garnacha tintorera et pour **Hernández-Jiménez et al. (2013)**, les données sur trois variétés espagnoles Monastrell, Syhra et Cabernet sauvignon et leurs hybrides, donnent des teneurs en anthocyanes non-acylées qui dépassent les 50%.

L'absence d'acylation dans les raisins rouges n'est pas bien comprise à l'heure actuelle, et deux différentes hypothèses peuvent être prises en compte, soit l'absence de gènes liés à la synthèse des acyltransférases, enzymes responsables de l'étape de l'acylation au cours de la biosynthèse, ou soit l'absence de gènes de régulation qui module l'expression de la série de gènes de l'acylation (**Revilla et al., 2012**). En outre et d'après **Tarrara et al. (2008)**, cette teneur élevée en anthocyanes non-acylés des variétés étudiées peut également s'expliquer par l'effet des températures auxquelles ont été exposées les baies de raisins qui ont stoppé et/ou ralenti l'activité des acyltransférases.

Pour les dérivés acylés (acétylés et coumaroylés), le Gros noir a présenté la teneur la plus élevée de l'ordre de $29.26 \pm 0.008\%$, ce qui explique sa couleur sombre, suivi du Cardinal 2, du Cardinal 1 et du Muscat noir avec respectivement $11.98 \pm 0.004\%$, $8.14 \pm 0.002\%$ et $7.17 \pm 0.002\%$; **Mizuno et al. (2006)**, ont rapporté pour les variétés Cabernet sauvignon, Red port et Pione, des anthocyanes totales qui ont été acylées respectivement à hauteur de 50%, 50% et 75%. L'acylation est considérée un des facteurs importants pour la coloration des pellicules de baies de raisin. D'après **Río Segade et al. (2009)**, les anthocyanes non acylés peuvent contribuer à la caractérisation variétale, tout comme les anthocyanes acylés.

Les dérivés coumaroylés sont les plus importants des anthocyanes acylés (**Mattivi et al., 2006**). Selon **Fournaud et al. (2006)**, le taux de dégradation des dérivés coumaroylés est supérieure à celui des dérivés non-acylés ou des dérivés d'acétylglucoside à haute teneur en sucres des pulpes (plus de 200 g/l); le Muscat noir a montré la plus forte teneur en sucres suivi par le Cardinal 1, Cardinal 2 et le Gros noir avec respectivement 21.01, 17.65, 17.30 et 17.05 °B ; le taux d'anthocyanes coumaroylés varie dans le sens contraire que les teneurs en sucres. Ces taux peuvent également s'expliquer par le fait que les dérivés coumaroylés sont hydrolysés pour restaurer les formes non-acylés, bien au fait que l'activité de cinnamoyltransferase pourrait diminuer par rapport aux autres activités intervenant dans la biosynthèse d'anthocyanes.

La présence de dérivés d'anthocyanes acétylés dans les pellicules des baies a été démontrée dans différents cépages dont Tempranillo, Palomino negro, Jaen tinto, Tintilla de Rota et Cabernet sauvignon (**Guerrero et al., 2009**) et Shiraz (**Boss et al., 1996**). D'autre part, Pinot noir manque complètement d'anthocyanes acylés (**Cortell et al., 2007**). Dans la présente étude, un faible taux d'acétylation a été enregistré de $1.29 \pm 0.004\%$ (Cardinal 2), $1.08 \pm 0.000\%$ (Cardinal 1), $0.68 \pm 0.001\%$ (Gros noir) et $0.43 \pm 0.002\%$ (Muscat noir), ce qui est en accord avec les travaux de **Cook-Papini et al. (2010)** qui ont rapporté des teneurs en anthocyanes acétylés ne dépassant pas 10% pour les trois variétés Albarossa, Barbera et Nebbiolo di Droner.

Le taux d'anthocyanes tri-substituées (malvidine, pétunidine et delphinidine) présente des différences hautement significatives ($p < 0.05$), il varie entre $26.39 \pm 0.005\%$ (Cardinal 1) et $82.13 \pm 0.001\%$ (Gros noir) en passant par $34.24 \pm 0.003\%$ (Cardinal 2) et $54.14 \pm 0.007\%$ (Muscat noir). La prédominance des anthocyanes tri-hydroxylés dans les cultivars à baies noirs avec une teinte violette et bleue a été associée à des rapports de transcription élevés de

F3'5'H / F3'H, par rapport aux cultivars rouges. Le Gros Noir a enregistré le taux le plus élevé en anthocyanes tri-hydroxylés ($82.13 \pm 0.001\%$), ce qui explique que le niveau de transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes est élevé par rapport à d'autres cultivars, ce qui signifie que cette voie est active dans les baies mures du Gros noir. Ceci est cohérent avec la forte teneur en flavonoïdes obtenue pour ce cultivar.

Les enzymes F3'H et F3'5'H qui ont été d'abord isolés dans la vigne (**Bogs *et al.*, 2006**), concurrencent pour l'hydroxylation du cycle B des flavonoïdes. Des études récentes ont montré que la F3'H est plus exprimée que la F3'5'H dans les fleurs, la tige et les jeunes baies. Dans les baies mures, la F3'H est fortement exprimée dans les deux cultivars blancs et rouges avant et après la véraison. À l'opposé, la F3'5'H est activée à la véraison dans les cultivars qui synthétisent plus d'anthocyanes tri-substitués (**Bogs *et al.*, 2006; Castellarin et Di Gaspero, 2007**). Ces résultats suggèrent un contrôle transcriptionnel important dans la détermination du degré d'hydroxylation du cycle B des anthocyanes, flavonols et proanthocyanidines. Cependant, le rôle de transcription des enzymes F3'H et F3'5'H dans la détermination de la composition en flavonoïdes n'est pas complètement clair. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnels ou autre spécificité de l'enzyme pourraient être impliqués.

La répartition du rapport anthocyanes tri-substitués sur anthocyanes di-substitués est associée à l'expression de F3'5'H et F3'H. **Castellarin et Di Gaspero (2007)**, ont montré que les taux de F3'5'H/UFGT et F3'5'H/F3'H sont fortement corrélés à la distribution de la proportion des anthocyanes tri-substitués et di-substitués dans plusieurs cépages. Les ratios élevés correspondent à un pourcentage élevé d'anthocyanes trisubstitués dans les baies.

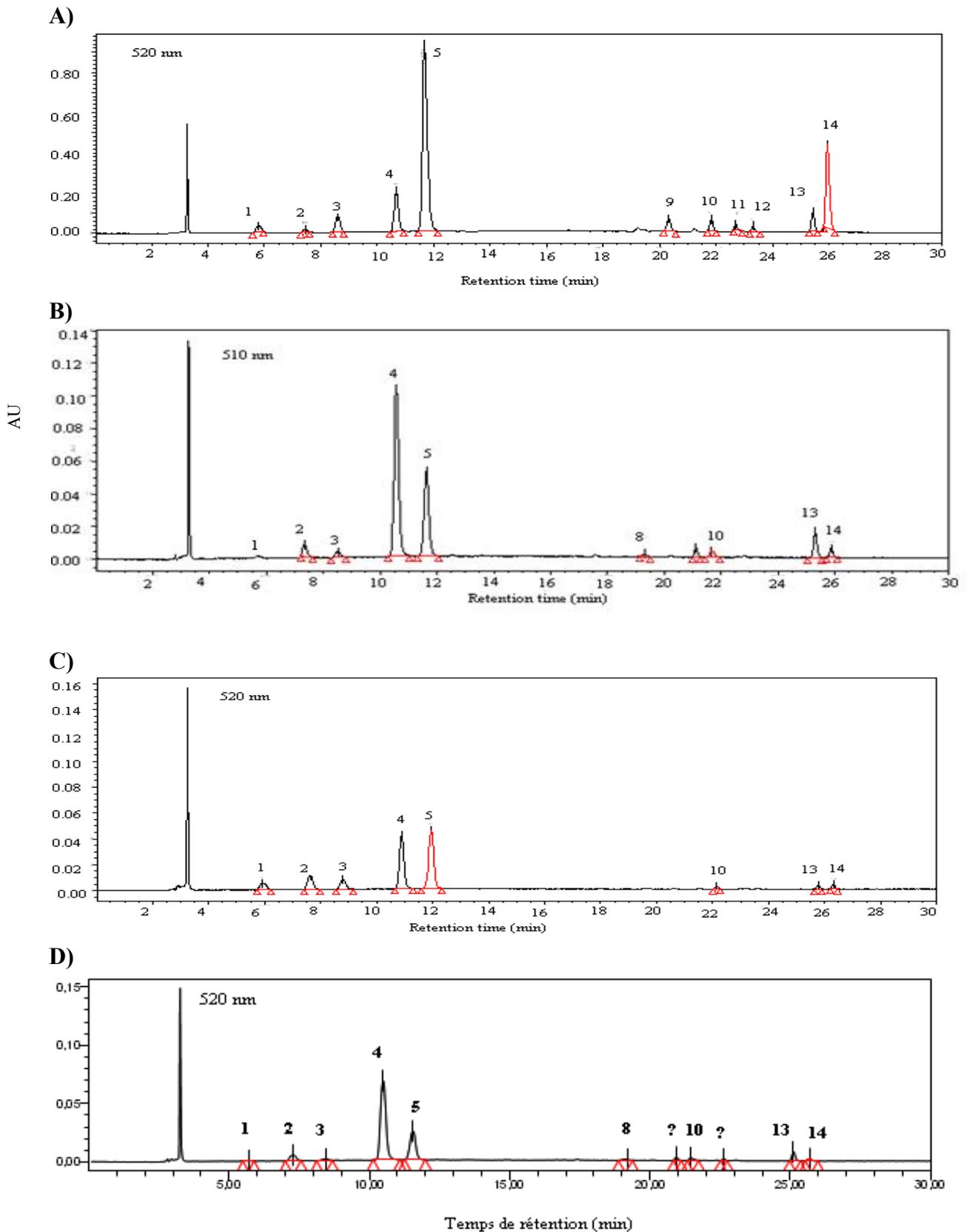


Figure 38. Profils chromatographiques des anthocyanes pelliculaires identifiées dans le Gros noir (A), Cardinal 2(B), Muscat noir (C), Cardinal 1(D) enregistrés à 520 nm.

*Pour l'identification des composés se référer à l'annexe n°3.

✦ *Relation entre la capacité antioxydante mesurée par le pouvoir réducteur et la teneur en anthocyanes des pellicules.*

Le PR des cépages étudiés présente une bonne corrélation linéaire avec les teneurs en ATL, avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0.6817$ ($r = 0.83$) (Fig.39). Ceci indique que ces substances contribuent significativement au PR des raisins. Une relation similaire a été trouvée par **Kalt et al. (1999)**, dans leurs travaux sur quatre espèces de fruits en baies, avec un coefficient $r = 0.90$. **Kallithraka et al. (2005)** ont rapporté une corrélation faible et statistiquement non significative entre la teneur en anthocyanes totale et la capacité antioxydante des extraits de pellicules de plusieurs cépages grecs à la récolte. Selon **Orak (2007)**, la capacité antioxydante de cépages rouges n'est pas toujours en relation avec la présence de leurs anthocyanes.

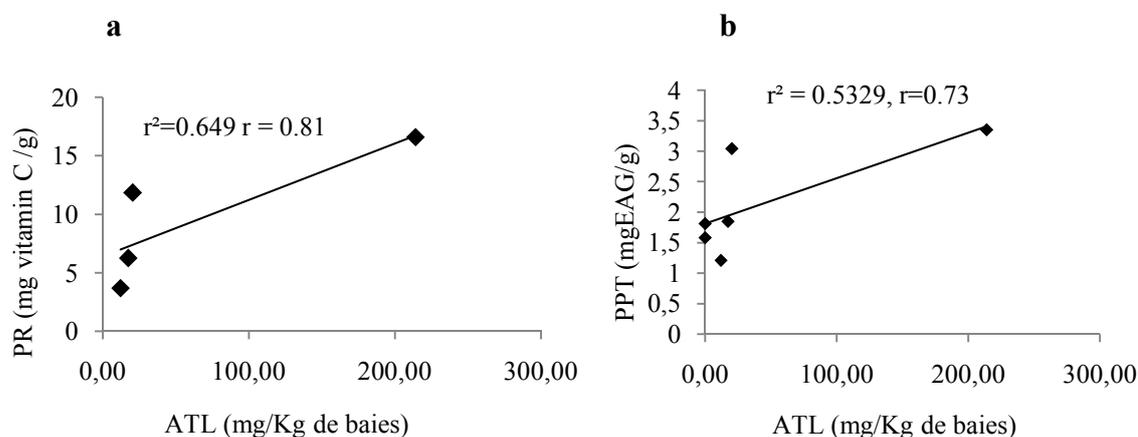


Figure 39. Corrélation entre le PR et les teneurs en ATL (a) et en PPT (b) des raisins

Les ATL sont également bien corrélés avec les PPT indiquant que ces deux substances évoluent de la même manière dans les cépages étudiés (Fig. 39). D'autres corrélations linéaires positives, avec des coefficients de corrélation "r" respectifs de 0.64 et 0.67, ont été constatées entre les ATL et la teneur en flavonols totaux et en tanins des extraits des pellicules de raisins analysés.

4.2 Flavonols

Les teneurs en flavonols, pigments jaunes des pellicules du raisin noir et blanc, présentent des différences hautement significatives ($p < 0.05$) ; ces teneurs sont comprises entre 12.32 ± 1.04 (Muscat blanc) et 49.13 ± 2.98 mg/kg de baies (Gros noir) (tableau XVII). Cette dernière variété contient 4 fois plus de flavonols que le Muscat blanc. Selon **Mattivi et al. (2006)**, la teneur en flavonols des pellicules de 91 variétés italiennes, dont 64 de raisin rouge et 27 de

raisin blanc, varie respectivement entre 3.81 et 80.37 mg/kg de baies et entre 1.36 et 30.21 mg/kg de baies. **Guerrero et al. (2009)** ont montré sur 5 variétés de raisin rouge cultivées en Andalousie des teneurs comprises entre 221 et 538 mg/kg de baies. Dans une autre étude, **Mélo et al. (2008)** ont noté que les teneurs en flavonols des variétés Italia et Patrícia sont respectivement de 2.38 ± 0.09 et 8.85 ± 0.68 mg/100g du poids frais.

Les différences des teneurs en flavonols par rapport à celles obtenues dans la présente étude sont probablement dues à plusieurs facteurs, parmi lesquels, la technique d'extraction et/ou la sensibilité de la méthode de dosage, les différences variétales et l'origine géographique des échantillons analysés.

Azuma et al. (2007) ont indiqué que les gènes Myb régulant la biosynthèse des anthocyanes (qui partagent la voie de biosynthèse des flavonoïdes avec les flavonols au point de la formation de dihydroflavonols), en plus de la régulation de l'expression du UFGT (gènes exprimés dans les cultivars rouges mais pas dans les blancs), semblent renforcer l'expression de tous les gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes du fait que la transcription de tous les gènes semble être légèrement plus active, ce qui expliquerait la concentration plus élevée de flavonols dans les raisins rouges par rapport aux raisin blancs (**Hernández-Jiménez et al., 2013**).

D'après **Bogs et al. (2006)** et **Castillon-munoz et al. (2007 ; 2009 ; 2010)**, la teneur totale en flavonols peut être considérée comme une caractéristique d'un cultivar de raisin. Cependant, la quantité totale de flavonols est directement dépendante de l'exposition de la plante au soleil. Tous les cépages analysés ont été cultivés sous les mêmes conditions climatiques, le mode de conduite de la vigne est différent, ce qui dans une large mesure, détermine le degré d'éclairement de la grappe de raisin. C'est le cas de la variété Victoria (raisin blanc) qui présente une teneur en flavonols (40.61 ± 0.07 mg/kg de baies) assez proche de celle du Gros noir et du Muscat noir. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que cette variété a été cultivée en mode pergola, qui permet de mieux exposer les baies au soleil. Le rôle de la lumière dans la synthèse des flavonols dans les baies de raisin semble bien établi. Les baies de Merlot exposés au soleil, présentaient une concentration en flavonols totaux presque 10 fois plus que celles des grappes ombragées (**Spayd et al., 2002 ; Tarrara et al., 2008**). En outre, la teneur en flavonol de la variété Victoria pourrait être le résultat de l'expression génétique des gènes correspondant ; et dépend aussi de la variété, de l'épaisseur de la pellicule, la dimension des baies et du rapport pellicule / baie.

Tableau XVII : Teneurs en différents flavonols des extraits de pellicules

Cépages	Total Flavonols (mg/Kg de baies)	Myricétol-3- O-glucoside	Quercétol-3- O-glucoside	Kaempférol-3- O-glucoside	Isorhamnétol-3- O-glucoside
Muscat B	12,32±1.04 ^a	<i>nd</i>	10,77±0.91 ^a	1,38±0.07 ^b	0,17±0.06 ^a
Cardinal 1	26,71±0.05 ^c	0.00±0.00 ^a	23,22±0.15 ^c	2,32±0.13 ^c	1,17±0.07 ^d
Cardinal 2	20,37±0.71 ^b	0.00±0.00 ^a	18,26±0.59 ^b	1,34±0.06 ^b	0,77±0.07 ^c
Gros Noir	49,13±2.98 ^e	5,42±0.55 ^b	39,45±2.26 ^f	<i>nd</i>	4,25±0.17 ^e
Muscat N	39,25±0.19 ^d	0.00±0.00 ^a	36,61±0.01 ^e	2,19±0.15 ^c	0,45±0.05 ^b
Victoria	40,61±0.07 ^d	<i>nd</i>	32,37±0.09 ^d	8,24±0.16 ^d	0.00±0.00 ^a

nd : non détecté

Les profils des flavonols des cinq cépages de raisins étudiés sont représentés dans les figures 40 et 41. Les résultats d'analyse chromatographique ont révélé la présence de quatre flavonols glucosylés suivants : myricétine, kaempférol, quercétine et isorhamnétol, dont la teneur varie significativement d'une variété à l'autre ($p < 0.05$) (tableau XVII). En regardant le profil des flavonols des variétés rouges, la quercétine 3-O-glucoside est le flavonol dominant (86.77%) ce qui est en agrément avec les travaux antérieurs (**Mattivi et al., 2006** ; **Castillo-Munoz et al., 2009** ; **Hernández-Jiménez et al., 2013**) ; suivi par l'isorhamnétine-3-O-glucoside (4.90%) ; puis dans l'ordre décroissant, le kaempférol 3-O-glucoside (4.32%) et la myricétine 3-O-glucoside (4%). La présence de la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine a été signalé dans les cépages rouges. La myricétine a été détectée uniquement dans le Gros noir. Concernant les flavonols des cépages blancs, la quercétine 3-O-glucoside est toujours le flavonol dominant (81.50%), suivie par le kaempférol 3-O-glucoside (18.17.32%) et enfin l'isorhamnétine-3-O-glucoside (0.32%).

Le kaempferol-3-O-glucoside était absent dans le Gros noir, la même observation a été faite par **Mattivi et al. (2006)** pour la variété de raisin rouge Tannat.

La myricétine 3-O-glucoside n'a pas été détectée dans les échantillons analysés, à l'exception du Gros noir avec une teneur de 5.42 ± 0.55 mg/kg ; ce résultat ne coïncide pas avec celui de **Mattivi et al. (2006)**, qui ont détecté la myricétine uniquement dans les cépages blancs, alors que **Tarrara et al. (2008)**, n'ont pas trouvé de myricétine 3-O-glucoside dans le Merlot (raisin noir), ce qui concorde avec les résultats de cette étude où ce flavonol n'a pas été enregistré dans les variétés rouges (Cardinal 1 et 2) et noires (Muscat noir) ; ce même flavonol a été trouvé à l'état de traces dans les variétés roses (**Mattivi et al., 2006**). Ceci

pourrait être dû probablement au fait que ces variétés contiennent de faibles quantités d'anthocyanes. D'après **Mattivi et al. (2006)**, les variétés ayant comme principaux dérivés anthocyaniques la cyanidine 3-glucoside et la péonidine 3-glucoside, comme par exemple le Cardinal et le Muscat noir, devraient provenir de cépages blancs à l'origine.

Bogs et al. (2006) n'ont pas trouvé une expression significative des enzymes F3'5'H et UFGT dans les variétés du raisin blanc, ce qui suggère une régulation de F3'5'H et UFGT au cours de la maturation des baies et justifie ainsi l'absence de flavonols trihydroxylés (myricétine) dans les raisins blancs.

Dans les cépages blancs, la présence de flavonols type isorhamnétine dans la pellicule a été suggérée après un traitement d'hydrolyse et la détection ultérieure de l'isorhamnétine aglycone libre (**Mattivi et al., 2006**) et aussi par la coïncidence des spectres UV-Vis et du temps de rétention chromatographique à un vrai niveau d'isorhamnétine 3-O-glucoside pris comme standard. Cependant, l'apparition de flavonols de type isorhamnétine et de type myricétine a été considérée comme exclusif de cépages rouges (**Castillon-Munoz et al., 2009 ; 2010**). Néanmoins, dans le présent travail, l'isorhamnétine 3-O-glucoside a été détectée dans le cépage Muscat blanc, qui n'est présent qu'à l'état de traces (0.17 ± 0.06 mg/kg de baies), ce qui coïncide avec les résultats de **Zhu et al. (2012)**.

En résumé, l'ensemble des résultats ci-dessus suggèrent que les cépages blancs ont des profils de flavonols caractéristiques qui ne contiennent que de flavonols de type 3-O-glycosides de quercétine, kaempférol et isorhamnétine, ce qui est en accord avec des résultats antérieurs (**Mattivi et al., 2006 ; Castillo-Munoz et al., 2010**).

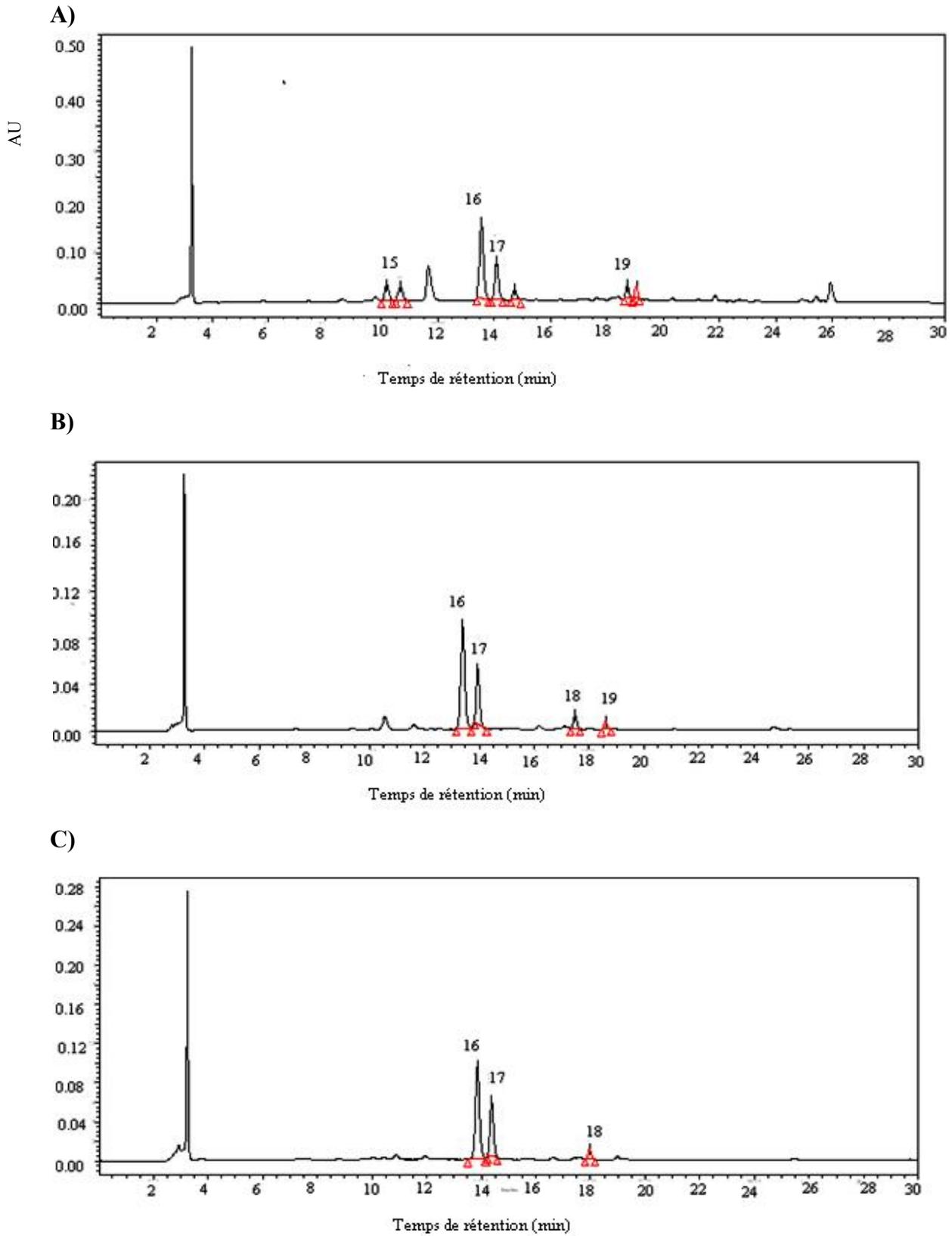
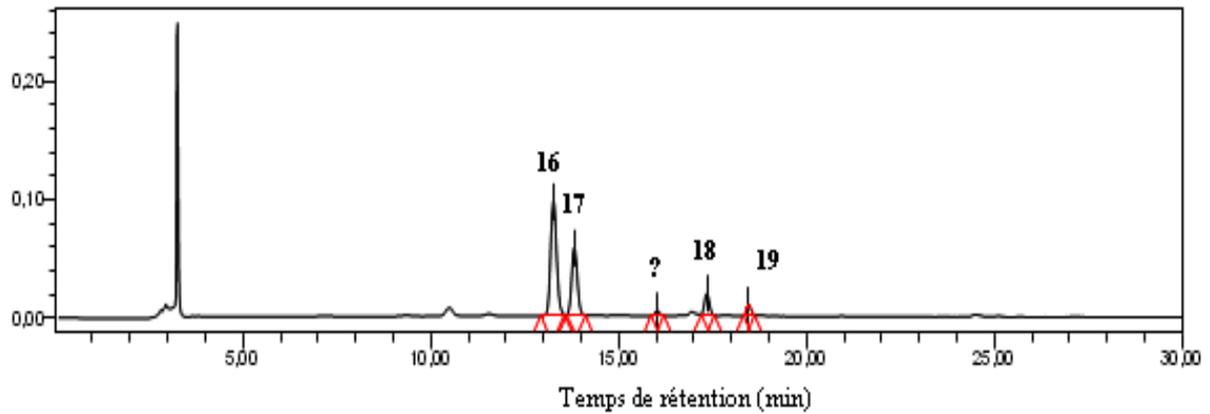
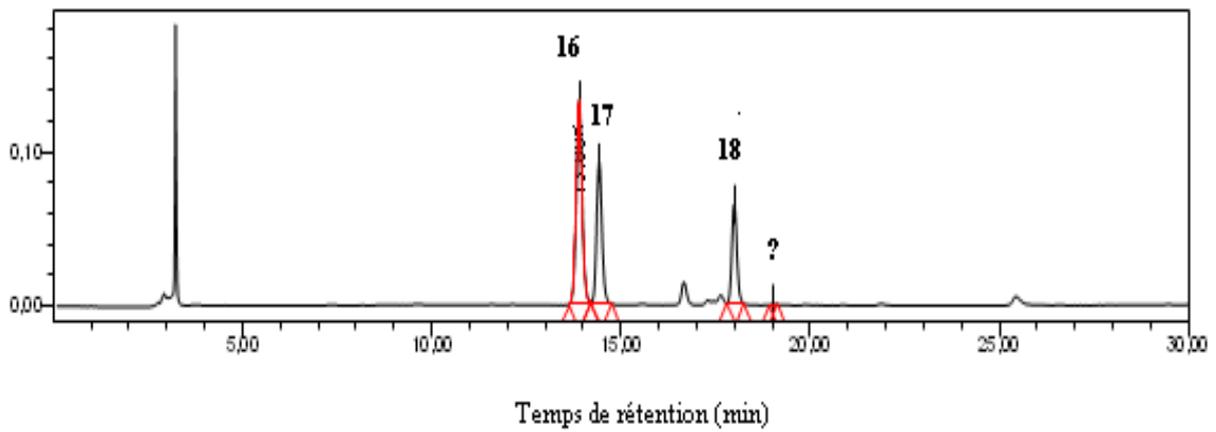


Figure 40. Profil chromatographique des flavonols des extraits de pellicules Gros noir (A), Cardinal 2 (B), Muscat noir (C) enregistré à 360 nm.

D)



E)



F)

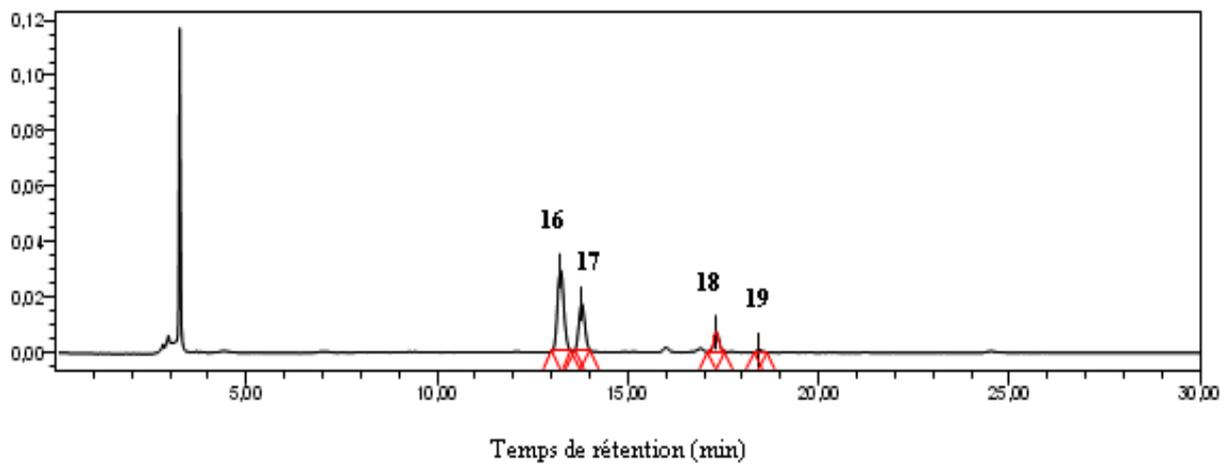


Figure 41. Profil chromatographique des flavonols des extraits de pellicules Cardinal 1 (D), Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistré à 360 nm

*Pour l'identification des composés voir se référer à l'annexe n°3.

✦ *Relation entre la capacité antioxydante mesurée par le pouvoir réducteur et la teneur en flavonols des pellicules.*

Les flavonols totaux sont moyennement corrélés avec l'activité antioxydante mesurée par le PR, le coefficient de corrélation n'était que de $r^2 = 0.2612$ ($r=0.51$) (Fig. 42) ; ceci s'explique par le fait que les flavonols ne contribuent pas significativement à l'activité antioxydante des raisins analysés. Le même résultat a été constatés par **Di Majo et al. (2008)**, qui ont trouvé un coefficient de corrélation (r^2) entre la capacité antioxydante (mesurée par le test de blanchiment de la crocine), la quercétine et la myricétine avec respectivement 0.16 et 0.53 sur 23 vins siciliens (Italie). D'autre part, des études récentes ont montré que les flavonols ont un impact négligeable sur le statut antioxydant total d'un vin donné.

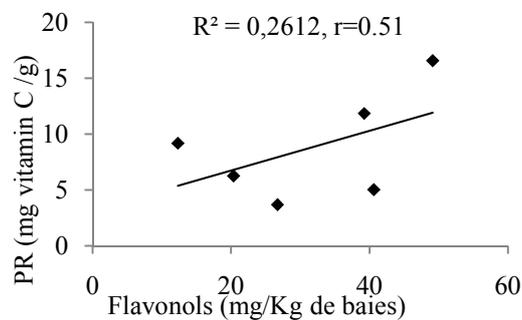


Figure 42. Corrélation linéaire entre le PR et la teneur flavonols totaux des extraits pelliculaires

4.3 Tanins

Ils sont caractérisés par les propriétés de donner des combinaisons avec les protéines et d'autres polymères tels que les polysaccharides. Les tanins se caractérisent par une sensation d'astringence (assèchement de la bouche).

Les résultats relatifs à la teneur en tanins des pellicules et pépins des cépages étudiés ainsi que le degré de polymérisation moyen (DPM) sont rassemblés dans le tableau XVIII. Comme il peut être noté, la teneur en tanins des extraits de pellicules varie significativement ($p < 0.05$) de 447.40 ± 31.25 pour Victoria à 1739.45 ± 107.27 mg/g de poids frais de baies pour le Muscat noir, et celle des pépins oscille entre 565.70 ± 113.56 pour Victoria et 1080.35 ± 87.04 mg/g de poids frais de baies pour le Gros noir, qui ne présente pas de différences statistiquement significatives ($p < 0.05$) avec le Muscat noir.

Les pépins sont beaucoup plus riches en tanins que les pellicules, ce qui a été précédemment rapporté pour d'autres cépages et dans d'autres régions par différents auteurs (**Brossaud et al., 1999 ; Jordão et Correia, 2012a,b**). Cependant, dans la présente étude, les teneurs en

tanins des pellicules des deux cépages Muscat noir et Gros noir sont supérieures à celles des pépins ; le même résultat a été observé par **Mateus et al. (2001)** sur deux variétés portugaises de raisin rouge de la région Douro, Touriga nacional et Touriga francesa, avec respectivement des valeurs variant entre 6.20 et 5.0 et entre 5.4 et 3.8 mg/g de baies pour les pellicules et les pépins ; ceci est pareil pour **Cerpa-Calderon et Kennedy (2008)** qui ont enregistré sur la variété américaine Merlot, des teneurs en proanthocyanidines des pellicules et des pépins avec respectivement 846 mg/kg et 644 mg/kg du poids frais. Cette tendance pourrait s'expliquer d'après ces auteurs, par de nombreux facteurs y compris la taille des baies, la variation post-véraison des tanins des pépins ; une extractibilité réduite résultant de la conjugaison de proanthocyanidines avec d'autres composants de la cellule tels que les polysaccharides (**Amrani- Joutei et al., 1994**).

D'après les travaux de **Brossaud et al. (1999)** sur les baies de Cabernet franc cultivé sur différents sites de la vallée de la Loire (France) - millésime 1995, les teneurs en proanthocyanidines (tanins condensés) oscillent entre 1.239 et 1.759 g/kg du poids frais de baies et entre 3.363 et 4.448 g/kg du poids frais dans respectivement, les pellicules et pépins. Dans une autre étude, **Lorrain et al. (2011)** ont obtenu sur deux variétés françaises de raisin rouge Cabernet sauvignon et Merlot, des teneurs allant de 90.1 ± 4.0 et 92.2 ± 4.5 pour les pépins et de 57.4 ± 0.4 à 63.8 ± 0.1 mg/g du poids sec pour les pellicules. Ces valeurs sont inférieures à celles de la présente étude (447.40 ± 31.25 à 1739.45 ± 107.27 mg/g de baies pour les pellicules et 565.70 ± 113.56 à 1935.85 ± 60.88 mg/g de baies pour les pépins).

Les teneurs en proanthocyanidines des raisins varient considérablement, en fonction du cépage, des conditions du milieu, en particulier l'alimentation en eau et l'exposition au soleil, la taille des baies et le nombre de pépins (**Cadot, 2010**), de la variété et l'année de récolte (**Sun et al., 2001**), le degré de maturation (**Jordão et al., 2001**; **Ó-Marques et al., 2005**) ; ces différences soulignent également l'impact des différents terroirs, les pratiques culturales, mais aussi les vendanges sur la voie de métabolisme des tanins (**Lorrain et al., 2011**). D'après **Mateus et al. (2001)**, les faibles altitudes semblent être favorables pour la synthèse des concentrations importantes en proanthocyanidines en relation avec les conditions climatiques.

La forme monomérique des proanthocyanidines représentée par le monomère flavan-3-ols catéchine et épicatechine ont été détectés dans les extraits de pellicules et pépins, mais n'ont pas pu être quantifiés (pic entre seuils de détection et de quantification) (Fig. 44, 45, 46 et 47), cela est dû probablement au fait que la catéchine ne représente qu'une faible proportion

(moins de 10%) des proanthocyanidines (**Sun et al., 2001**), ou à une inter-conversion entre la catéchine et l'EGC au cours de la maturation des raisins analysés (**Bordiga et al., 2011 in Jordão et Correia, 2012b**). D'après **Liang et al. (2012)**, les contenus en (+)-catéchine et l'épicatéchine sont nettement inférieurs à ceux des deux autres monomères (EGC et EGC).

Le tableau XVIII et la figure 43 montrent clairement que les tanins des pellicules se distinguent de ceux des pépins par une plus faible teneur en dérivés galloylés (% ECG ou % galloylation), un DPm élevé et la présence de dérivés de prodephinidines (EGC), comme il a été observé également par d'autres auteurs pour d'autres cépages (**Souquet et al., 1996 ; Kennedy et al., 2000b ; Cerpa-Calderon et Kennedy, 2008 ; Obreque-Slier et al., 2010**).

Dans la présente étude, les valeurs enregistrées varient de manière significative d'une variété à l'autre ($p < 0.05$) de 11.04 ± 0.14 (Gros noir) à 28.55 ± 0.56 (Muscat blanc) ; de 3.19 ± 0.0012 (Muscat noir) à 7.21 ± 0.0023 % (Cardinal 2) et de 9.93 ± 0.001 (Victoria) à 21.83 ± 0.003 % (Muscat noir) pour respectivement le DPm, % ECG et % EGC des pellicules. Cependant, dans les pépins, les dérivés de prodephinidines n'ont pas été détectés, ce qui est une tendance générale ; tandis que les résultats obtenus pour le DPm et les teneurs en dérivés galloylés (% ECG), varient significativement ($p < 0.05$) de 4.14 ± 0.14 (Victoria) à 5.68 ± 0.02 (Muscat blanc) et de 21.28 ± 0.012 (Muscat noir) - qui ne diffère pas significativement du Victoria - à 26.25 ± 0.004 % (Muscat blanc), respectivement.

Les travaux d'**Obreque-Slier et al. (2010)** sur deux variétés de raisins (Carménère et Cabernet sauvignon) en provenance de Chili, montrent des DPm respectivement de 10.0 ± 3.7 et de 6.4 ± 1.1 dans les pellicules et de 2.0 ± 0.2 et de 1.8 ± 0.2 dans les pépins. Alors que le %ECG varie entre 12.2 ± 0.3 et 7.3 ± 2.9 (pellicule) et entre 20.6 ± 5.5 et 18.7 ± 5.5 (pépins) pour respectivement les deux variétés.

Les présents résultats sont différents de ceux de certains rapports précédents, sur plusieurs cépages cultivés dans divers pays, dans lesquels, la (+)-catéchine était toujours le monomère flavan-3-ol prédominant, suivi par (-)-épicatéchine et (-)-épigallocatechine ; d'autre part, les monomères EGC et ECG n'ont pas été détectés dans les pellicules de raisin (**Munoz et al., 2008**). Ces différences suggèrent que la proportion de monomères flavan-3-ol varie considérablement entre les différents cépages avec peut-être une certaine influence régionale et éventuellement de la gestion viticole, de plus, les méthodes de la catalyse acide utilisées pour le fractionnement des tanins sont différentes.

Les différences entre les cépages étudiés, les facteurs climatiques, l'année et les pratiques viticoles pourraient être partiellement responsables des différences distinctes dans les valeurs et les tendances des DPm en comparaison avec d'autres résultats publiés (Liang *et al.*, 2012). Les valeurs obtenues pour le DPm, montrent aussi que les tanins des pellicules se présentent sous formes polymériques (DPm > 12 – 15), alors que ceux des pépins se présentent sous formes monomériques et oligomériques (DPm varie de 2 à 12 – 15) (Jordão et Correia, 2012a).

Enfin, les résultats obtenus montrent que la composition en proanthocyanidines et de ses divers sous-unités diffèrent significativement d'une variété à une autre. Ceci pourrait être la raison des différences dans l'astringence des cépages étudiés.

Tableau XVIII : Le DPm et teneurs en tanins totaux des extraits de pellicules et de pépins

Cépages	Pellicules		Pépins	
	Tanins totaux (mg/g de baies)	(DPm)	Tanins totaux (mg/g de baies)	DPm
Muscat B	511.35±7.14 ^a	28.55±0.56 ^e	1935.85±60.88 ^e	5.68±0.02 ^d
Cardinal 1	537.25±35.28 ^a	16.33±1.19 ^c	1332.90±95.88 ^d	4.59±0.0 ^{b,c}
Cardinal 2	574.95±5.16 ^a	14.34±0.14 ^b	871.95±45.04 ^b	4.50±0.01 ^b
Gros Noir	1721.90±87.96 ^b	11.04±0.14 ^a	1080.35±87.04 ^c	4.77±0.10 ^c
Muscat N	1739.45±107.27 ^c	18.54±0.15 ^d	932.75±10.96 ^{b,c}	4.52±0.07 ^b
Victoria	447.40±31.25 ^a	15.03±0.49 ^{b,c}	565.70±113.56 ^a	4.14±0.14 ^a

Les teneurs en tanins sont exprimées en mg par g de baies. Les valeurs portant la même lettre dans chaque colonne ne diffèrent pas significativement ($p < 0.05$). Les résultats sont classés par ordre croissant; $a < b < c < d$.

Le Muscat blanc présente le DPm le plus élevé dans les pellicules et pépins, ce qui explique son caractère d'astringence. D'après Cadot *et al.* (2006), la polymérisation homogène des proanthocyanidines pendant la synthèse entre la nouaison et la véraison augmente l'astringence à mesure que leur taille augmente, tandis que la combinaison avec les anthocyanes diminue la réactivité, et par conséquent l'astringence des composés formés. Indépendamment du millésime, le DPm et % de galloylation des tanins des pépins semblent être des outils appropriés afin de discriminer la variété Muscat blanc des autres variétés.

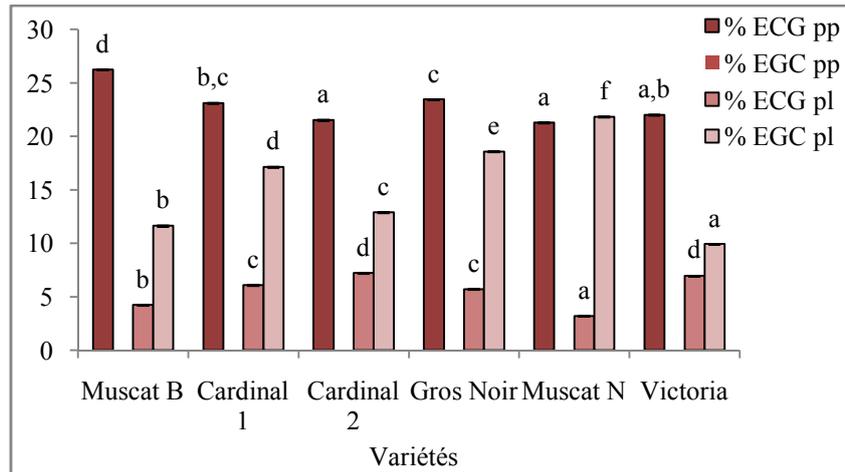


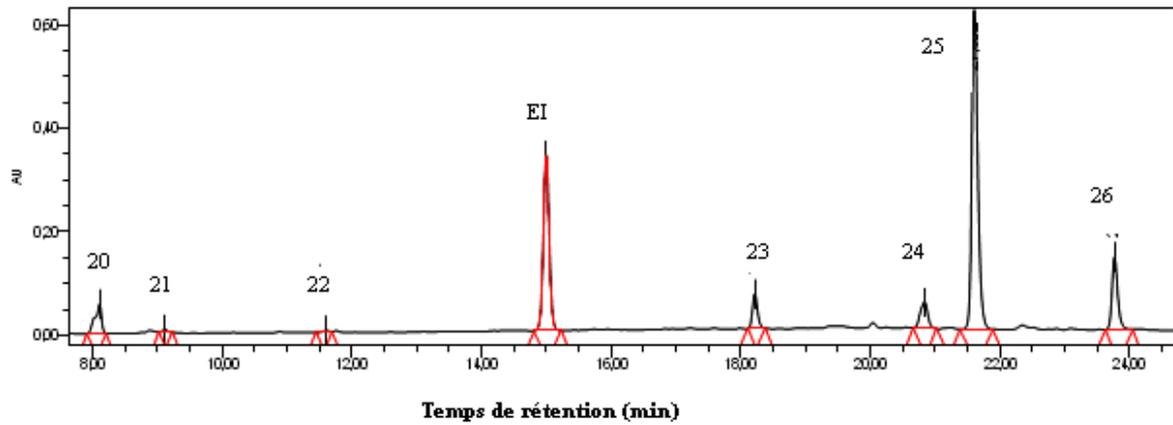
Figure 43. Teneurs en épicatechin-3-O-gallate et épigallocatechine des pépins (ECGpp et EGCpp) et des pellicules (ECGpl et EGCpl) des différentes variétés de raisins analysées.

Les barres verticales représentent les écart types

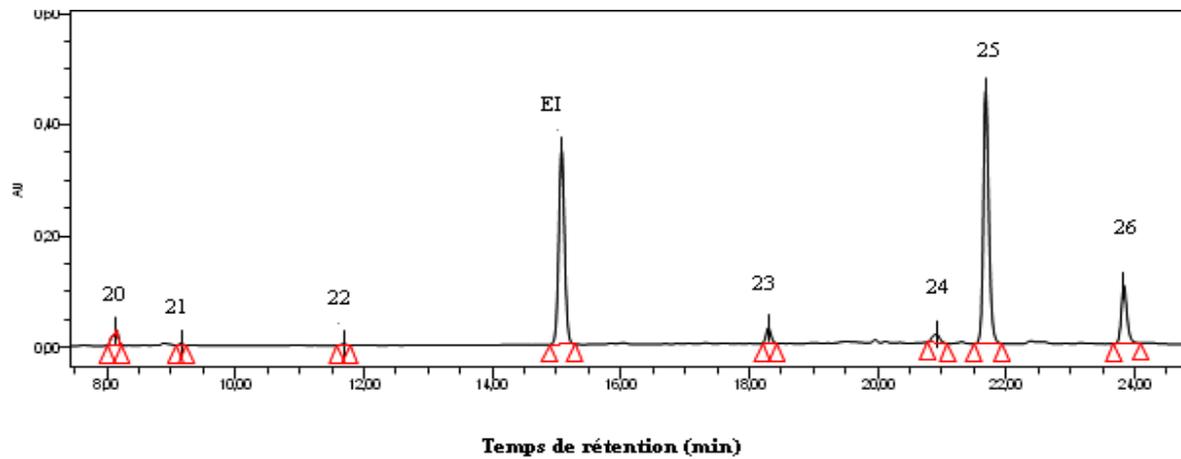
Des lettres différentes indiquent des résultats différents à $p < 0.05$

Devant l'hétérogénéité de ces observations, le débat reste donc ouvert quant aux modifications éventuelles affectant les tanins pendant la phase de maturation. On sait aujourd'hui, par l'apport des nouvelles techniques d'analyse biochimique et des connaissances sur l'expression des gènes impliqués dans la production de ces composés, que la biosynthèse active des tanins de la pellicule et des pépins (la pulpe aussi) s'opère au stade vert, au moment de la formation de la baie. Pendant la maturation, cet arrêt d'accumulation laisse ainsi le champ libre à la production active d'anthocyanes, dont la voie de biosynthèse est en partie commune à celle des tanins.

A)



B)



C)

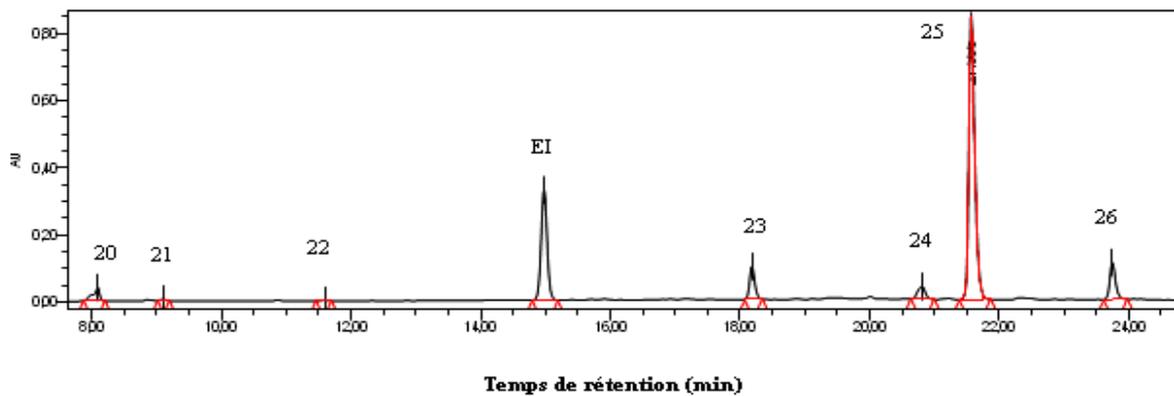
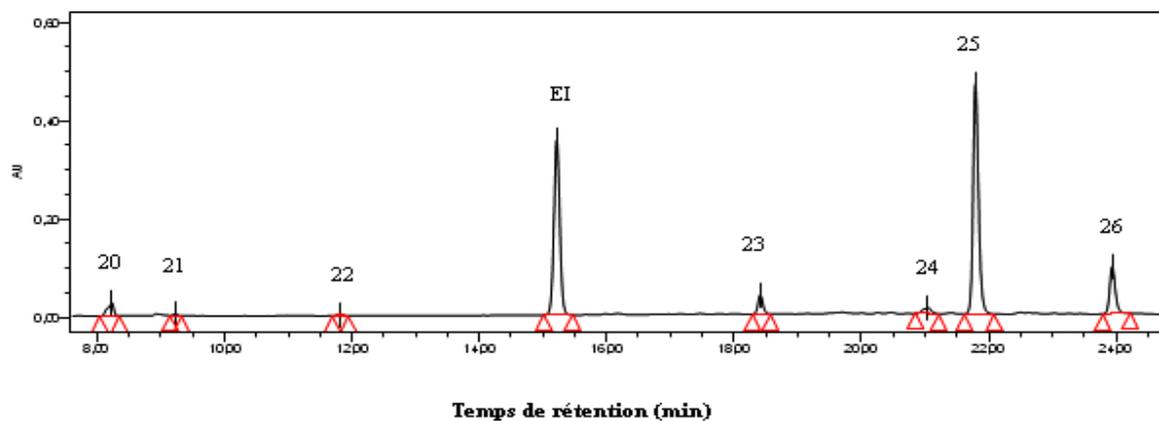


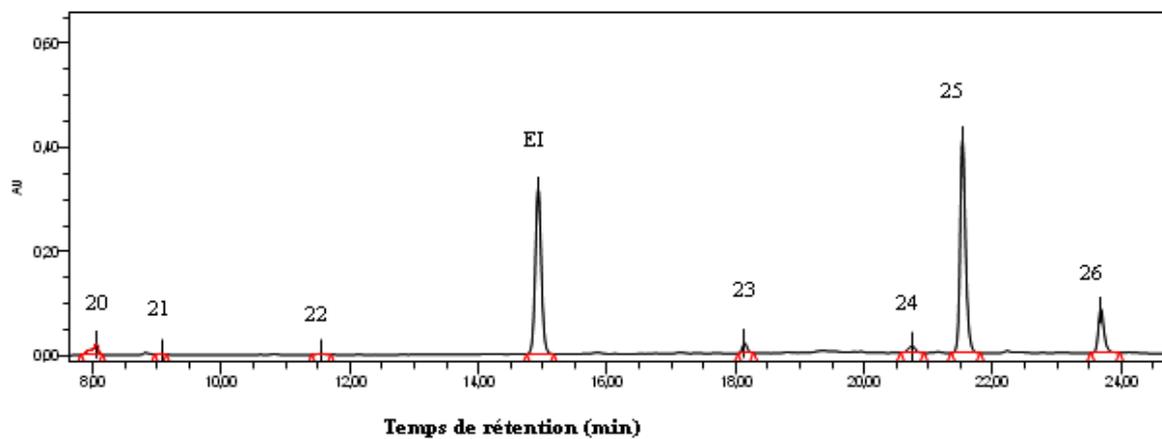
Figure 44. Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits pelliculaires du Gros noir (A), Cardinal 2 (B), Muscat noir (C) enregistrés à 280 nm

*Pour l'identification des composés se référer à l'annexe n°3.

D)



E)



F)

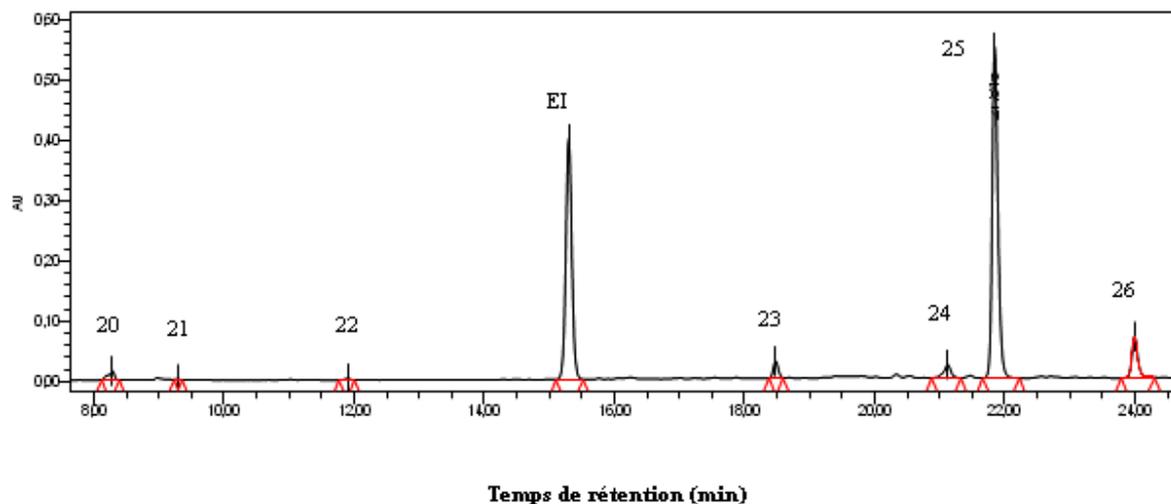
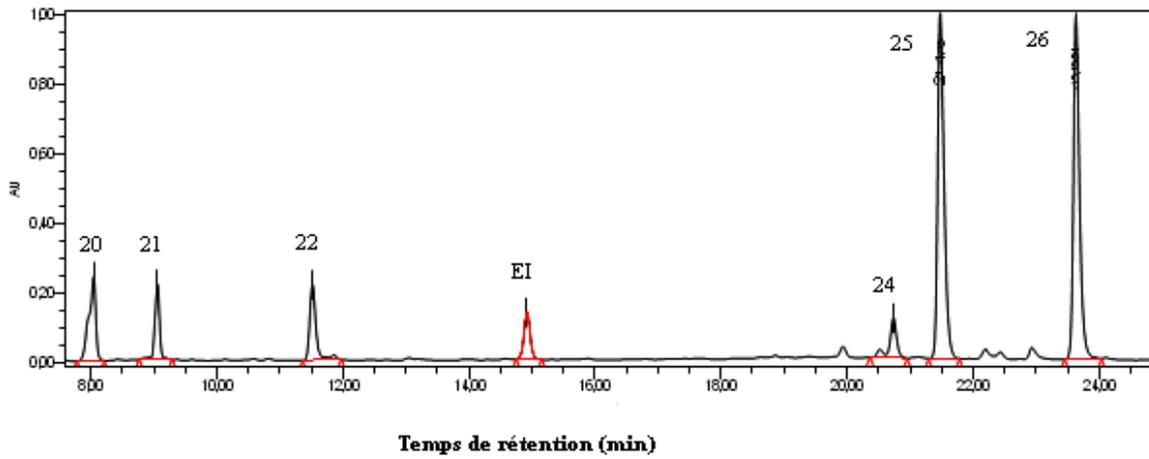


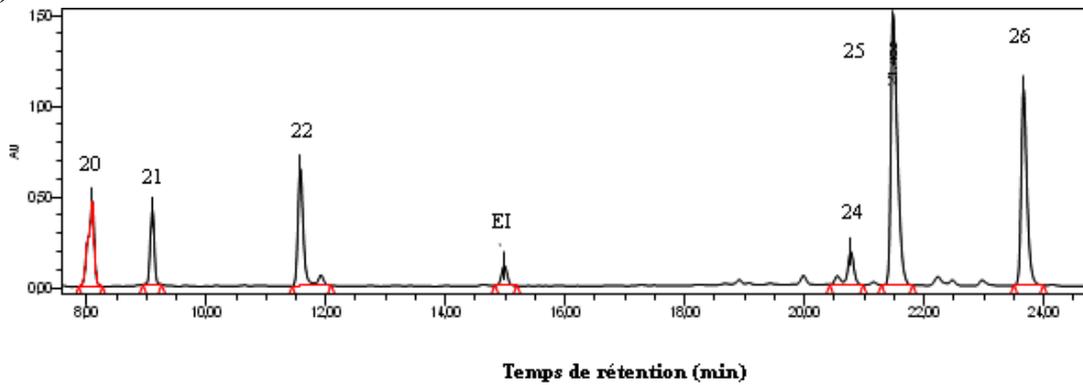
Figure 45. Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits pelliculaires Cardinal 1(D), Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistrés à 280 nm

*Pour l'identification des composés se référer à l'annexe n°3.

A)



B)



C)

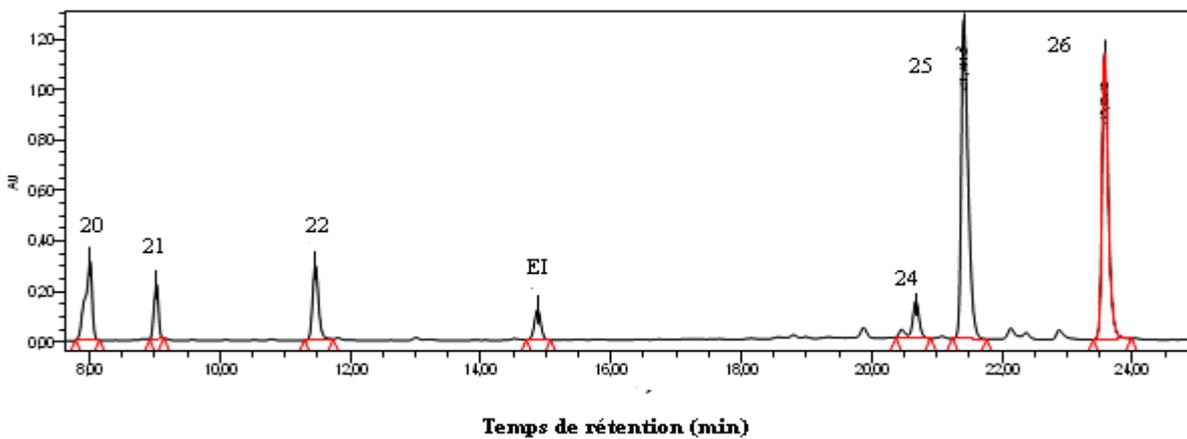
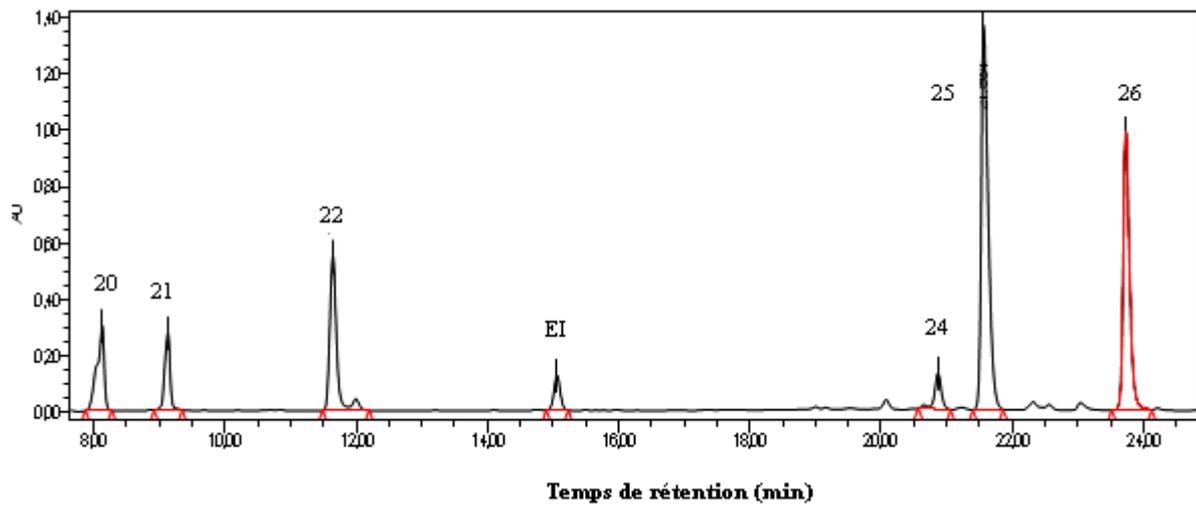


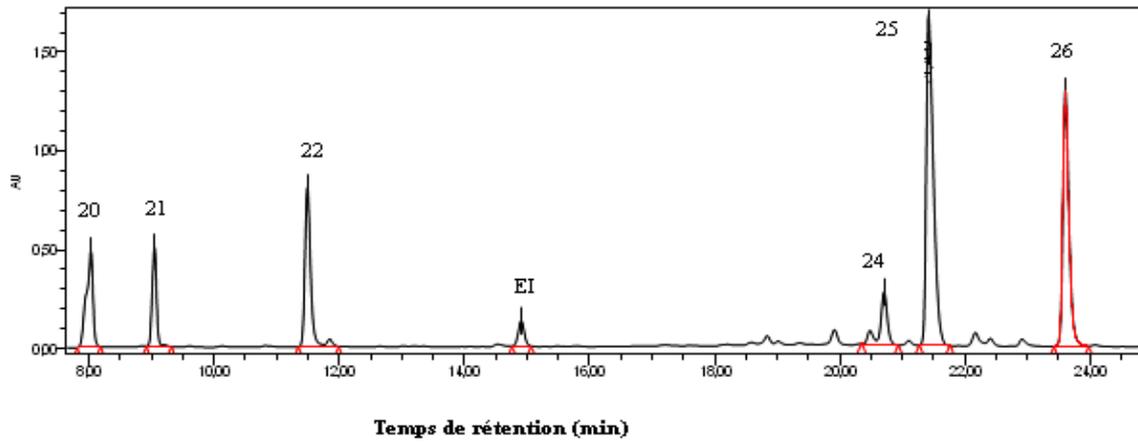
Figure 46. Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits de pépins du Gros noir (A), Cardinal 2(B), Muscat noir (C) enregistrés à 280 nm

*Pour l'identification des composés se référer à l'annexe n°3.

D)



E)



F)

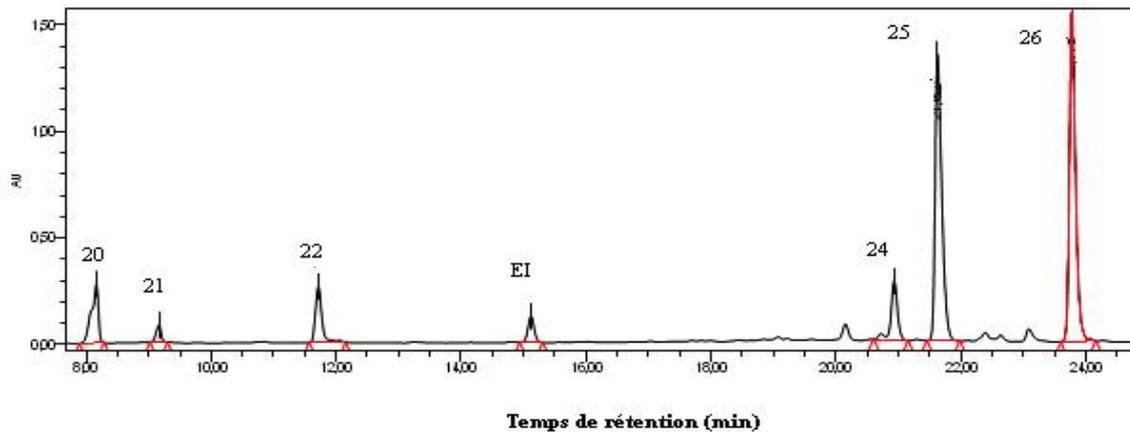


Figure 47. Profil chromatographique des proanthocyanidines des extraits de pépins du Cardinal 1 (D), Victoria (E) et Muscat blanc (F) enregistrés à 280 nm

*Pour l'identification des composés se référer à l'annexe n°3.

✦ *Relation entre la capacité antioxydante mesurée par le pouvoir réducteur et la teneur en tanins des pellicules et pépins*

Le PR des extraits des raisins étudiés présente une bonne corrélation linéaire positive avec les teneurs en tanins des pellicules (Fig.48), ce qui n'est pas le cas des tanins des pépins ; un résultat similaire a été trouvé par **Jordão et al. (2012b)**, où la capacité antioxydante était beaucoup plus positivement corrélée avec les teneurs des différentes fractions des tanins (monomériques, oligomériques et polymériques) des pellicules avec respectivement $r^2 = 0.82$, 0.83 et 0.82 , que celles des pépins avec $r^2 = 0.62$, 0.72 et 0.74 pour la variété portugaise Touriga nacional. Alors que la variété Tinta roriz présentait des coefficients de corrélation plus faibles pour les pellicules avec respectivement $r^2 = 0.35$, 0.76 et 0.59 et pour les pépins $r^2 = 0.57$, 0.17 et 0.47 . D'après **Di Majo et al. (2008)**, l'inhibition des radicaux libres a tendance à augmenter avec le DPM.

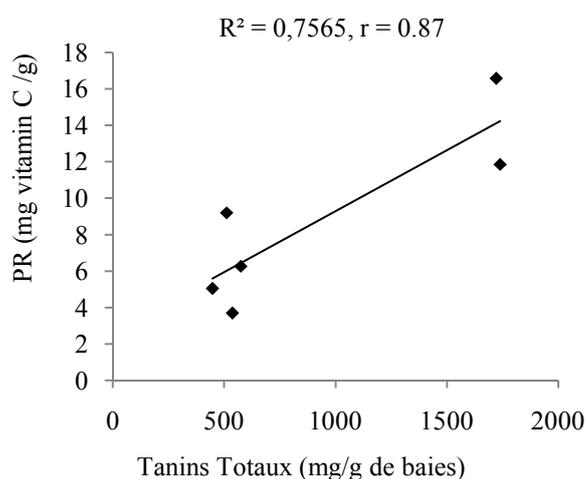


Figure 48. Relation linéaire entre le PR et les teneurs en tanins totaux des pellicules

Il est important de considérer que la majorité des travaux présentent les résultats de la capacité antioxydante de chaque fraction de baie de raisin après analyse individuelle. Ainsi, il est difficile de comparer les résultats de cette étude avec ceux obtenus pour les autres variétés de raisin. Il est nécessaire de noter également que d'une manière générale, il existe de grandes variations de valeurs de la capacité antioxydante quantifiée dans les différents cépages mentionnés dans la littérature en raison des différentes méthodes de mesure utilisées, différents cépages et espèces étudiées, les facteurs caractérisant le millésime et les conditions climatiques.

5. Analyse en composantes principales (ACP) et son interprétation

Durant cette étude, nous avons pu qualifier et/ou quantifier un grand nombre de facteurs, c'est pourquoi nous avons opté pour l'Analyse en Composantes Principales ou ACP. En effet, cette technique d'analyse statistique permet de déterminer la variabilité d'un grand nombre de facteurs, mais également d'établir l'ensemble des corrélations mathématiques existantes entre les différents facteurs, ainsi que d'obtenir des représentations graphiques (répartition des différents facteurs et des individus au sein de deux axes orthonormés). Pour réaliser les ACP, nous avons utilisé le logiciel XLSTAT 2014.

Dans un premier temps, chacune des variables étudiées est centrée et réduite, c'est à dire que chaque variable est ramenée à des valeurs comprises entre -1 et +1, l'ACP est alors dite normée. Cette étape permet donc de donner le même poids à l'ensemble des facteurs étudiés.

Dans un deuxième temps, les corrélations mathématiques entre les différentes variables centrées et réduites sont calculées. Les fortes corrélations vont nous permettre de déterminer les variables qui évoluent dans le même sens (corrélation positive) ou dans le sens contraire (corrélation négative). Il est important de noter que ces corrélations n'établissent que des relations mathématiques et non pas des relations de causalité. Les facteurs les mieux corrélés entre eux vont permettre de définir un même axe du graphique.

Dans un troisième temps, l'analyse en composante principale à proprement dite est réalisée. Le logiciel nous donne les valeurs propres et la variance expliquée par chaque facteur, ce qui nous permet de choisir le nombre d'axes qui méritent d'être retenus pour l'étude. Le choix du nombre d'axes est basé sur le pourcentage de la variabilité totale que l'on souhaite traiter, l'idéal étant de traiter au moins 60 % de l'information sur un minimum d'axes car la multiplication du nombre d'axes rend plus difficile l'interprétation de l'analyse. Les espaces retenus seront donc à une dimension (c'est-à-dire des droites) ou, et c'est le cas le plus fréquent, à deux dimensions, c'est-à-dire des plans.

Pour interpréter l'ACP, il faut d'abord donner une signification aux axes. Pour chaque axe, les variables sont caractérisées par leur score factoriel (coordonnée sur l'axe), leur contribution absolue, c'est à dire le pourcentage d'information qu'apporte la variable dans la définition de l'axe, et leur contribution relative, c'est à dire la valeur de la corrélation avec l'axe. Les facteurs (ou variables) peuvent aussi être représentés graphiquement par le cercle des corrélations. Les facteurs qui seront retenus seront ceux qui présentent les plus forts scores et les plus fortes corrélations et contributions.

Une fois les axes définis, chaque individu (ou modalité) est défini par sa position au sein des repères orthonormés formés par les axes et par sa contribution absolue et relative et il est alors possible d'attribuer à chaque individu les variables qui le caractérise.

5.1 Analyse en composantes principales des résultats d'analyse du sol

5.1.1 Matrice de corrélation

Avant d'entamer l'analyse des résultats par l'utilisation de l'ACP, il est intéressant d'avoir une idée sur les liaisons existantes entre les variables prises deux à deux (Tableau XIX). Les corrélations positives et significatives entre différents paramètres sont marquées en noir et en gras dans la table de corrélation, ce qui signifie que ces couples évoluent de la même manière et dans le même sens ; alors que les corrélations négatives et significatives apparaissant en rouge et en gras signifient que ces couples évoluent de manière différente et dans des sens contraires.

5.1.2 Choix des composantes principales

Le choix du plan d'interprétation de l'ACP est basé sur l'expression de l'inertie des axes et les plans qu'ils constituent. Ces valeurs sont représentées en pourcentage des valeurs propres totales.

Tableau XIX: Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux

	F1	F2	F3
Valeur propre	8.349	4.651	3.000
Variabilité (%)	52.183	29.066	18.751
% cumulé	52.183	81.249	100.000

Le premier axe principal à une valeur propre égal à 8.349, il explique 52.183% de la variation totale, la seconde composante égale à 4.651 et explique 29.066% de la variance totale. Les pourcentages de variation sont assez élevés pour les deux premiers axes avec un cumule de 81.249%. Pour nos interprétations, nous allons alors se limiter aux deux premiers axes factoriels (F1, F2).

5.1.3 Définition des composantes principales

La contribution de chaque variable dans l'expression de la composante principale est donnée par la valeur du rapport de corrélation entre la variable et l'axe factoriel considéré, autant que ce rapport est important, autant que la variable contribue à l'expression de l'axe. La combinaison linéaire des variables initiales définit le gradient de chaque composante. Le tableau XX de la corrélation des variables aux principaux axes factoriels, montre que les variables sont mieux représentées avec l'axe1 (F1).

L'axe F1 est défini par la combinaison des variables (pH, porosité, densité réelle, carbone, matière organique, calcaire totale, calcaire actif et l'azote total) est exprime une variabilité de 52% .

L'axe F2 exprime une variabilité de 29% et combine l'expression des variables (CE, humidité, porosité, densité apparente, ammoniacque et HCO_3^{2-})

Tableau XXI: Rapport de corrélation entre les variables et les facteurs (composantes principales)

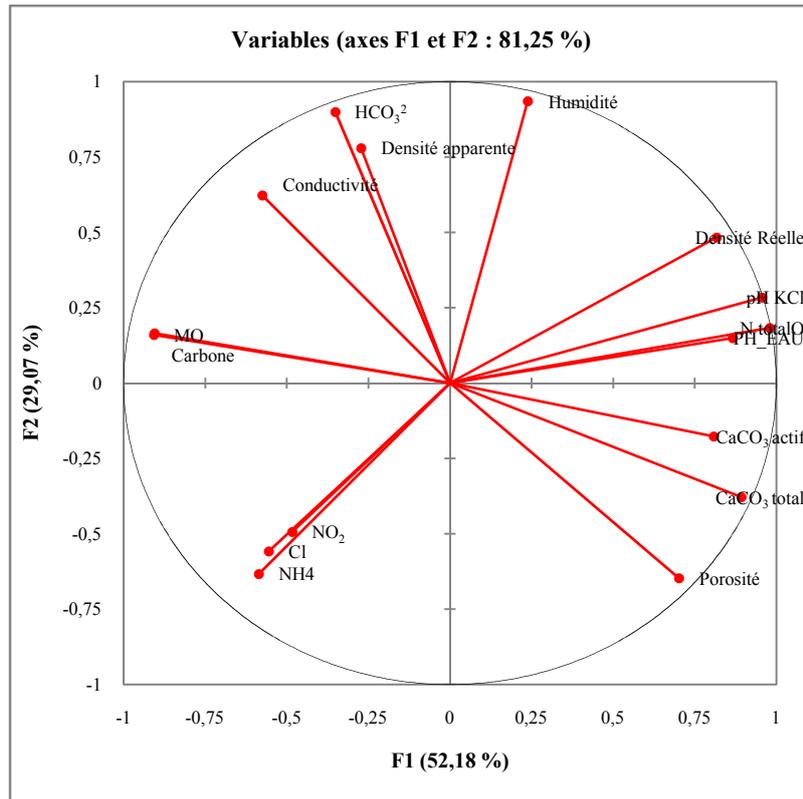
	F1	F2
pH_{eau}	0,866	0,149
PH_{KCl}	0,955	0,283
Conductivité	-0,575	0,623
Humidité	0,238	0,935
Porosité	0,701	-0,647
Densité Réelle	0,817	0,483
Densité apparente	-0,273	0,780
Carbone	-0,906	0,165
MO	-0,907	0,160
CaCO₃ total	0,893	-0,378
CaCO₃ actif	0,808	-0,177
NO₂	-0,484	-0,493
NH₄	-0,586	-0,633
Cl	-0,556	-0,558
N total	0,980	0,183
HCO₃²⁻	-0,352	0,899

5.1.4 Représentation graphique de l'ACP

Le plan F1xF2 des variables (cercle de corrélation) ainsi formé représente l'expression de deux gradients physicochimiques et permet de lire le plan F1xF2 Sites (Fig. 49).

Le Plan F1xF2 sites représente l'ordination et le regroupement des sites suivant l'expression des gradients physicochimiques définit précédemment.

Les sites 2 et 3 ont des caractéristiques assez semblables (ils sont proches dans la projection); il s'agit de sols peu acides, humides, poreux, calcaires et ayant des teneurs élevées en azote total, mais des teneurs faibles en carbone, matière organique et en éléments nutritifs. A l'opposé du site 4 qui a un sol sec, acide, non calcaire, qui se caractérise par une grande teneur en éléments nutritifs, en carbone et en matière organique, une CE importante, mais une faible teneur en azote total ; le site 1 partage les mêmes caractéristiques avec le sol du site 4 ; sauf qu'il a un sol basique, humide et riche en azote.



Plan F1 - F2

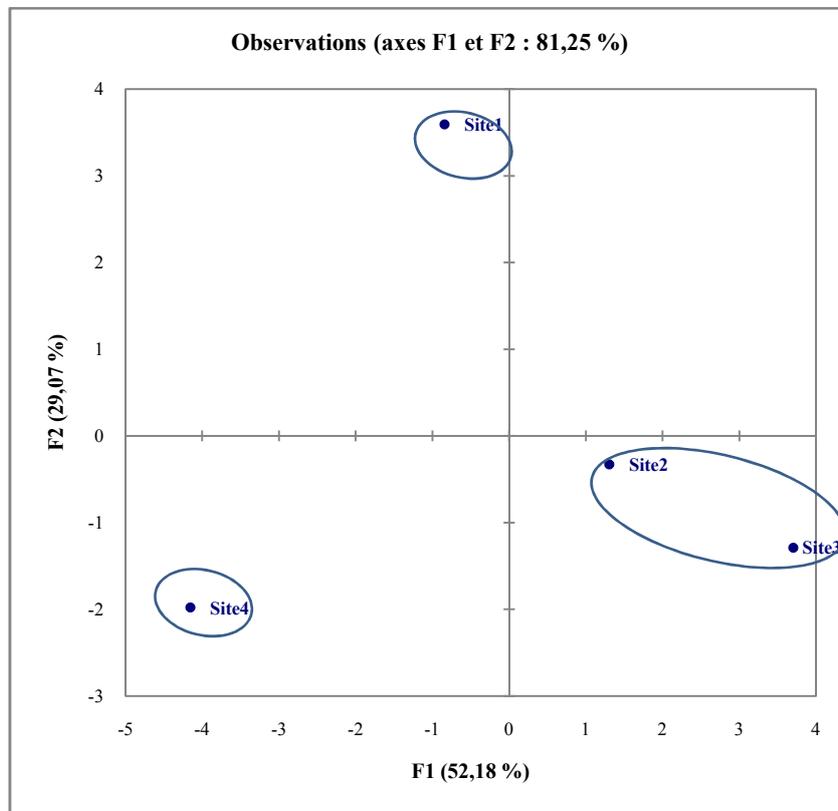


Figure 49. Cercle des corrélations et projections des individus dans le plan factoriel F1 - F2

5.2 Analyse en composantes principales des anthocyanes de pellicule

L'ACP a été réalisé sur les résultats des dosages par HPLC de 11 variables (anthocyanes) sur 06 objets (variétés de raisin). Les résultats de cette analyse nous ont permis d'ordonner et de regrouper les variétés sur la base d'une expression de synthèse des descripteurs anthocyanes qui les positionne sur un plan maximisant la variabilité du nuage représentant la matrice des données.

Les résultats de l'ACP (anthocyanes) sont interprétés dans ce qui suit et révèle des aspects intéressants

5.2.1 Matrice de Corrélations

Les résultats de la matrice des corrélations deux à deux (Coefficient de corrélation de Pearson) exprime la structure des variables et révèle le degré de liaison de certaines variables tel que Dp et Pt ($r = 0.93$); Mv et Anth.Coumar ($r = 0.94$) (voir Tableau XXII). Ces fortes corrélations sont mises au profit pour définition des gradients qui sont définis sur le plan des projections de l'ACP.

Tableau XXII: Coefficient de corrélation (coefficient de Pearson "r") entre les variables

	ATL	Dp	Cn	Pt	Pn	Mv	Anth. Acét	Anth. Coumar	Di- sub/tri- sub	Anth.Co um-acét	Anth non acylée s
ATL	1,00										
Dp	0,33	1,00									
Cn	-0,04	0,73	1,00								
Pt	0,63	0,93	0,66	1,00							
Pn	-0,17	0,08	0,72	0,14	1,00						
Mv	0,85	0,65	0,48	0,88	0,25	1,00					
Anth. Acét	0,16	0,03	0,56	0,22	0,91	0,48	1,00				
Anth. Coumar	0,95	0,36	0,18	0,68	0,13	0,94	0,46	1,00			
Di- sub/tri- sub	0,82	0,72	0,53	0,92	0,24	0,99	0,44	0,90	1,00		
Anth. Coum- acét	0,93	0,37	0,21	0,68	0,17	0,94	0,49	1,00	0,91	1,00	
Anth non acylées	0,24	0,55	0,89	0,64	0,85	0,69	0,83	0,50	0,70	0,53	1,00

Les corrélations les plus significatives sont marquées en gras.

5.2.2 Choix des composantes principales

Pour l'interprétation de l'ACP la règle préconise le choix des axes exprimant le maximum de variabilité (valeur propre > 1).

La valeur propre pour le premier axe principal est égale à 6.860 il explique 62.361% de la variation totale, la seconde composante égale à 2.611 et explique 23.740 % de la variance totale. Ces axes totalisent un pourcentage d'inertie égale à 86.102 % de la variance totale. Nous avons jugé suffisant de limiter notre interprétation sur le résultat de ces deux axes.

Tableau XXIII: Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux

	F1	F2	F3	F4
Valeur propre	6.860	2.611	1.502	0.026
Variabilité (%)	62.361	23.740	13.659	0.240
% cumulé	62.361	86.102	99.760	100.000

5.2.3 Définition des composantes principales

ACP Variables (Cercle de corrélation)

En se basant sur le tableau ci-dessous et qui donne les contributions des variables sur l'expression de chaque axe factoriel (corrélation entre les variables initiales et les axes factoriels). On remarque que toutes les variables sont bien corrélées à l'axe principal (F1), à l'exception de la variable Pn, qui est corrélée avec le deuxième axe principale (F2).

Tableau XXIV: Corrélation entre les variables les facteurs (axes principaux)

	F1	F2
ATL	0,728	-0,644
Dp	0,688	0,006
Cn	0,643	0,656
Pt	0,888	-0,130
Pn	0,427	0,853
Mv	0,978	-0,205
Anth. Acét	0,597	0,593
Coumar	0,865	-0,389
Di-sub/tri-sub	0,980	-0,188
Coum-acét	0,881	-0,346
Anth No acyl	0,822	0,567

5.2.4 Représentation graphique de l'ACP

La première composante principale (F1), a une influence dominante, avec une expression de 62.36 % de la variabilité totale (effet taille). Il est fait ressortir un gradient positif regroupant l'effet de toutes les variables étudiées, à l'exception de la variable Pn. Cette dernière s'exprime sur le deuxième axe avec une variabilité de 23.74 % de la variance totale. La variable ATL est partagée entre les deux axes est contribue sur l'axes 2 à définir un gradient négatif.

✘ ACP Objet (variétés)

Le plan des objets exprime une double ordination sur les deux axes :

- Sur L'axe F1 nous constatons la succession dans l'ordination des variétés avec les variétés (Victoria et Muscat blanc), ensuite (Cardinal 1et 2), ensuite (Muscat noir) et enfin le Gros Noir en tête ;
- Sur l'axe F2 nous constatons une superposition entre le groupe des variétés (Victoria et Muscat blanc,) et le groupe (Gros Noir) et en situation intermédiaire le groupe (Cardinal 1et 2 et Muscat noir)

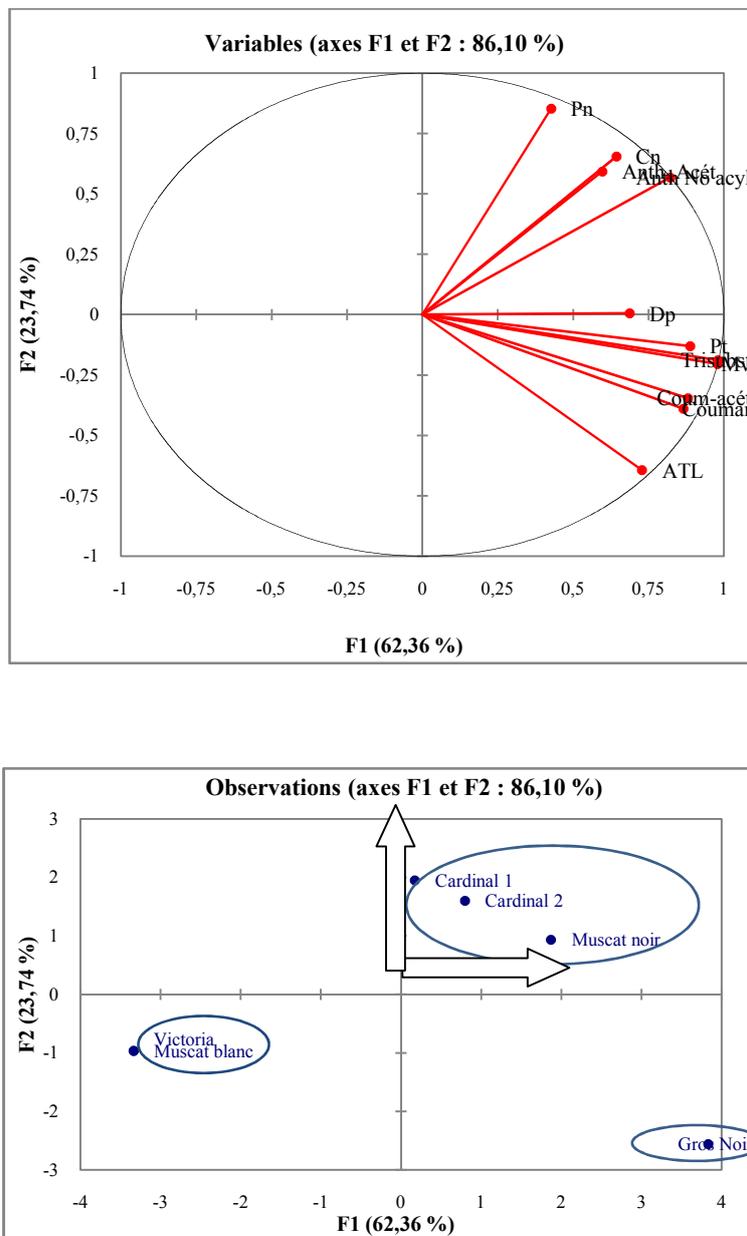


Figure 50. Projection des variables (cercle des corrélations) et projections des individus (variétés) dans le plan factoriel F1 - F2

✘ *Dualité entre ACP variable et ACP variété*

La double lecture des deux plans factoriels nous permet de dégager 3 groupes de variétés :

- Groupe 1 : les variétés Victoria et Muscat blanc (raisins blancs ne renfermant pas d'anthocyanes ;
- Groupe 2 : le Gros noir avec une teneur importante en ATL et un faible contenu en Pn3glu ; et enfin
- Groupe 3 : Cardinal 1, Cardinal 2 et Muscat noir qui présentent un contenu assez proche en différentes anthocyanes, avec une faible teneur en ATL.

5.3 Analyse en composantes principales des résultats d'analyse HPLC des flavonols et tanins des pellicules et des pépins

5.3.1 Matrice de corrélation

L'ACP a été réalisé sur les résultats d'analyse obtenus par HPLC des flavonols (pellicules) et tanins (pellicules et pépins) sur 13 variables. Le tableau XXV donne les corrélations les plus significatives entre les différents facteurs étudiés.

Tableau XXV: Coefficient de corrélation (Pearson "r") entre les variables

	Tan pép	DPm pép	ECG pép	Tan pell	DPm pell	ECG pell	EGC pell	Tot Flavo	Myric etol-3-G	Querc étol-3-G	Kaem férol-3-G	Isorh amné tol-3-G
Tan pép	1,00											
DPm pép	0,91	1,00										
ECG pép	0,90	0,93	1,00									
Tan pell	-0,17	-0,07	-0,25	1,00								
DPm pell	0,77	0,75	0,69	-0,32	1,00							
ECG pell	-0,46	-0,45	-0,27	-0,55	-0,58	1,00						
EGC pell	-0,04	-0,16	-0,30	0,84	-0,26	-0,57	1,00					
Tot Flavo	-0,64	-0,53	-0,48	0,68	-0,71	0,01	0,46	1,00				
Myrice tol-3-G	-0,04	0,13	0,14	0,62	-0,51	0,04	0,35	0,62	1,00			
Quercé tol-3-G	-0,65	-0,56	-0,55	0,75	-0,68	-0,09	0,58	0,99	0,55	1,00		
Kaemf érol-3-G	-0,54	-0,51	-0,31	-0,45	-0,08	0,35	-0,52	0,20	-0,44	0,16	1,00	
Isorh amné tol-3-G	-0,01	0,06	0,08	0,60	-0,58	0,09	0,45	0,56	0,96	0,50	-0,55	1,00

Les corrélations les plus significatives sont marquées en gras

5.3.2 Choix de composantes principales

Nous avons retenu les deux premières composantes principales F1, F2 qui nous ont permis de rendre compte de 76.845% de la variabilité totale de l'ensemble des données. En effet, la valeur propre de la première composante principale est égale à 5.495, elle explique 45.793 % de la variation totale, celle de la seconde composante est égale à 3.726 et explique 31.052 % de la variance totale.

Tableau XXVI: Valeurs propres et pourcentages cumulés des axes principaux

	F1	F2	F3	F4	F5
Valeur propre	5.495	3.726	1.710	0.877	0.192
Variabilité (%)	45.793	31.052	14.249	7.306	1.600
% cumulé	45.793	76.845	91.094	98.400	100.000

5.3.3 Définition des composantes principales

Le tableau XXVII montre clairement la contribution des variables étudiées sur l'expression des axes. Nous distinguons Tan pép, DPm pép, ECG pép, Tan pell, DPm pell, Tot Flavonols et Quercétol-3-G qui sont bien représentées sur l'axe F1, ce qui n'est pas le cas pour les variables EGCpell, EGC pell, Myricetol-3-G, Kaemférol-3 G et Isorhamnétol-3-G qui sont, cependant, bien corrélées avec l'axe F2.

Tableau XXVII: Corrélations entre les variables et les axes factoriels (composantes principales)

	F1	F2
Tan pép	-0,763	-0,610
DPm pép	-0,706	-0,649
ECG pép	-0,706	-0,520
EGC	0,000	0,000
Tan pell	0,668	-0,647
DPm pell	-0,883	-0,210
ECG pell	0,161	0,638
EGC pell	0,543	-0,586
Tot Flavonols	0,922	-0,089
Myricetol-3-G	0,560	-0,615
Quercétol-3-G	0,934	-0,112
Kaemférol-3-G	0,070	0,816
Isorhamnétol-3-G	0,572	-0,621

5.3.4 Représentation graphique de l'ACP

Le résultat du plan représentant le cercle de corrélation et le plan représentant la projection des variétés sur les deux axes F1 et F2 (Fig. 51) révèlent une distinction claire entre les différentes variétés de raisins étudiées.

Les variétés Gros noir et Muscat noir sont décrites sur la première composante principale F1. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en flavonols totaux et quercétine. Le groupe de la variété le Gros noir est caractérisé par sa richesse en myricetol-3-G et en isorhamnétol-3-G. Le deuxième groupe comporte le raisin rouge, Cardinal 1 et 2, qui partagent les mêmes caractéristiques en termes de teneur en différents composés étudiés. Concernant les raisins blancs, chaque variété compose à elle seule un groupe à part ; la variété Victoria se trouvant en position significativement élevée dans la partie positive de l'axe F2 ; Ce groupe est caractérisée par des teneurs élevées en kaempférol-3-G et ECG des pellicules. Et enfin, le dernier groupe dans la partie négative de l'axe F1, comportant le Muscat blanc caractérisé par ses pépins ayant un important DPm, une teneur élevée en tanins et en ECG, et ses pellicules ayant le DPm le plus élevé.

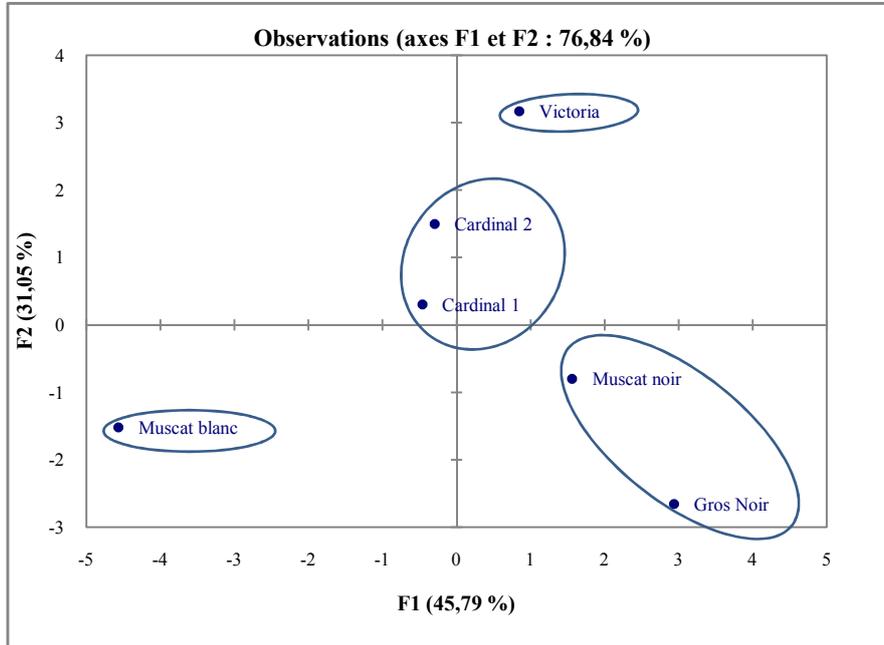
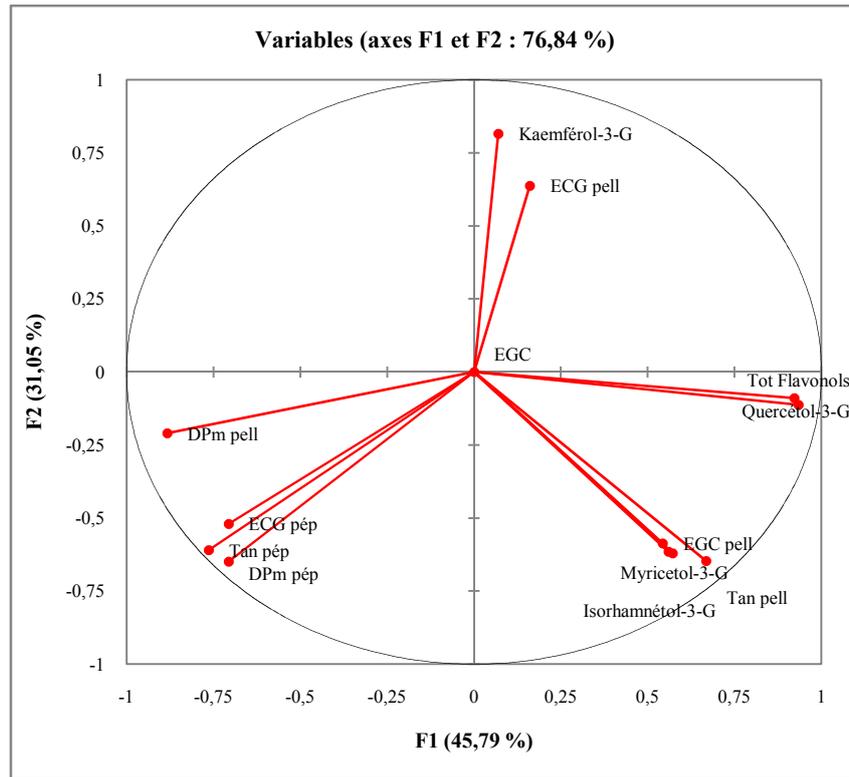


Figure 51. Cercle des corrélations et distribution des individus dans le centre de l'axe orthogonal formé par les composantes F1 et F2

Conclusions & Perspectives

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Le but de cette étude est la détermination de l'effet du sol sur la teneur en composés antioxydants de quelques variétés de raisins de la région d'El-Tarf (Nord-Est Algérien). Trois cépages rouges ('Cardinal', 'Gros noir' et 'Muscat noir') et deux cépages blancs ('Muscat blanc' et 'Victoria') ont été étudiés. Différents outils analytiques ont été utilisés pour la caractérisation physico-chimique du sol, la quantification des antioxydants et pour l'acquisition des profils polyphénoliques. Nous avons eu recours à une multitude de techniques d'analyses quantitatives, à savoir la spectrophotométrie et des techniques classiques telles les dosages par titrimétrie, et qualitative par la chromatographie liquide haute performance (HPLC) des composés antioxydants pour la caractérisation des lots de raisins. Ensuite, nous avons appliqué des méthodes statistiques multivariées (test LSD, l'analyse de la variance ANOVA, et l'analyse en composantes principales ACP) pour discriminer les différents sites d'échantillonnage par rapport à leurs propriétés physico-chimiques et les lots de raisins par rapport à leur composition en antioxydants et à leur environnement.

L'analyse quantitative par spectrophotométrie et autres techniques analytiques classiques utilisées pour la réalisation des différentes mesures se sont révélées intéressantes pour la caractérisation physico-chimique des sites d'échantillonnage et les différents cépages étudiés.

L'analyse quantitative par spectrophotométrie des antioxydants des raisins ne s'est pas montrée efficace pour discriminer les lots échantillonnés en différents vignobles. Il s'agit de méthodes économiques, faciles d'accès et rapides mais non spécifiques qui ne permettent pas de doser individuellement les antioxydants mais d'estimer leur quantité totale. Néanmoins, les résultats obtenus par cette technique analytique révèlent que les raisins étudiés sont une source importante en antioxydants notamment en caroténoïdes et en polyphénols totaux et que le Gros noir et le Muscat noir sont les cépages les plus riches en ces composés suivis du Cardinal et des deux cépages blancs. Par ailleurs, le Muscat blanc est aussi source de caroténoïdes au tant que les cépages colorés.

La méthode de dosage des polyphénols des extraits polyphénoliques bruts des pellicules et pépins par HPLC est intéressante du fait qu'elle est précise, applicable sur poudre de raisin et permet la différenciation individuelle des polyphénols. Les polyphénols de la pellicule et des pépins sont les composés les plus discriminants. Dans cette étude nous avons tenu compte des anthocyanes, des flavonols et des tanins. Nous disposons de nombreuses informations sur ces

métabolites secondaires des raisins qui sont particulièrement sensibles aux facteurs de l'environnement. Dans le cas des raisins rouges, les profils des anthocyanes ont été largement utilisés pour des fins d'authentification de cultivars. Les profils de flavonols ont également démontré une certaine capacité de différenciation de cultivars rouges et blancs, même si les résultats n'ont pas toujours abouti à des conclusions cohérentes.

L'effet « type de sol » n'est pas significatif pour expliquer les différences entre les cépages étudiés en termes de composition phénolique. Néanmoins, dans le présent travail, des relations entre composition phénolique des raisins et caractéristiques du sol peuvent être signalées, concernant notamment la teneur en caroténoïdes totaux. Ces relations semblent beaucoup plus faibles, voire inexistantes quand il s'agit de généraliser à un type de sol. Cependant, la conséquence majeure de type de sol peut être expliquée principalement par son influence sur la disponibilité en eau de la plante, bien que la température puisse être considérée comme un facteur important intervenant particulièrement dans la biosynthèse de composés antioxydants.

La diversité de la composition phénolique peut s'expliquer par une multitude de facteurs. Selon le type de sol de la vigne, le raisin ne possèdera pas les mêmes teneurs en polyphénols et par conséquent, les mêmes propriétés gustatives. De plus, l'exposition au soleil est aussi importante, plus le raisin sera exposé au soleil, plus il sera sucré. Finalement, la synthèse des composés phénoliques semble être beaucoup plus dépendante du climat que du site d'implantation. Outre les facteurs environnementaux, les différences enregistrées entre différents cépages peuvent être imputables aux diverses méthodes de dosage utilisées. Par ailleurs, les composés phénoliques dans la biosynthèse de *Vitis vinifera* est sous contrôle génétique et les différences entre les cépages sont parfois assez grande pour utiliser la composition phénolique du raisin comme un outil pour l'authentification de cultivars et de différenciation...De plus et du fait de l'absence de données disponibles dans la littérature concernant les cépages étudiés dans le présent travail, il serait imprudent de juger sur leur contenu en antioxydants et leur pouvoir antioxydant. L'usage des polyphénols doit tenir compte de la spécificité variétale bien que ces composés soient très caractéristiques du climat général et local. Il faudra étudier les éventuelles interactions entre l'effet cépage et les effets des facteurs de l'environnement.

Cette étude nous a permis d'acquérir un grand nombre de résultats sur les caractéristiques de quelques cépages de raisin de la région d'El-Tarf. Nous avons également pu mettre en évidence les facteurs du sol qui influencent le plus les caractéristiques de ces raisins.

Les fruits présentent une grande diversité de composition, de par leur richesse en composés primaires et en métabolites secondaires. La nature et la concentration de ces composés sont sous l'influence de l'environnement et peuvent être modulées par les pratiques culturales. Ces facteurs agissent en interaction, ce qui complique la compréhension et la prédiction de la qualité du fruit, et renforce l'intérêt des modèles pour ces études. Les connaissances sur les relations entre génotypes, environnement et pratiques en vue d'orienter la composition en sucres, acides, métabolites secondaires restent encore parcellaires. L'effort de recherche est à renforcer dans ce domaine, car nous pensons que l'amélioration de la qualité passe en grande partie par un choix judicieux des pratiques culturales adaptées à chaque variété.

L'application combinée de ces méthodes analytiques et chimiométriques contribuera à la caractérisation qualitative des raisins cultivés en conditions viticoles, en permettant d'évaluer des degrés de similitudes ou de différences par rapport à des standards conservés dans une base de données. Ces informations apportent des connaissances sur la composition et la qualité des raisins. Ces méthodes ouvrent la possibilité d'étudier en détail les incidences des conditions environnementales et de leur variation sur la qualité du raisin. Ces études étaient limitées jusqu'à présent par leur caractère multifactoriel : facteurs du milieu naturel ou modifiés par le viticulteur et de la réponse des raisins. Ces résultats contribuent au progrès de la viticulture raisonnée et à une meilleure appréciation de la qualité de la vendange. De plus, il serait souhaitable d'intégrer toutes les connaissances acquises dans des modèles de fonctionnement du fruit qui est potentiellement importants pour l'innovation. En effet, ce sont des composants essentiels de modèles de culture pouvant être utilisés pour une conception de conduites dirigée vers la maîtrise d'une qualité complexe et de sa variabilité.

Cependant, il serait intéressant de compléter et d'approfondir cette étude par une approche plus systémique. En effet, l'analyse en composantes principales nous a permis de mettre en évidence le rôle important des propriétés du sol et du climat sur la qualité des raisins, mais il nous a été difficile de discerner l'importance relative de chacun d'eux du fait de leur interaction. Ainsi, il serait intéressant d'étudier chacun des facteurs séparément. Par exemple, il serait possible d'étudier l'effet du stress hydrique, ou de la nutrition minérale en régime hydrique non limitant, ou de la température et de l'éclairement, sur la maturation et la qualité

des raisins en culture hors-sol de longue durée. Il serait également intéressant d'étudier, en plein champ, l'effet de la fertilisation sur différents types de sols, de l'enherbement, et du mode de conduite de la vigne.

Enfin, l'ensemble des résultats de ces analyses, obtenus uniquement avec des raisins appartenant à cinq variétés provenant de la saison 2012, doivent être répétées sur plusieurs saisons afin de confirmer les qualités réelles de ces raisins et leur garantir la place qui leur revient sur le marché mondial des raisins. Cela permettra aussi de sélectionner les meilleures variétés et de répandre leur culture à travers le territoire national et aboutir ainsi à des appellations d'origine contrôlée (AOC) algériennes.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, D.O. (2006).** Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 249-256.
- Alexeyev, M.F., Ledoux, S.P. & Wilson, G.L. (2004).** Review: Mitochondrial DNA and aging. *Clinical Science*, 107, 355–364.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. (1993).** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 7915-7922.
- Amrani-Joutei, K., Glories, Y. & Mercier, M. (1994).** Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, 33, 133- 138.
- Antal, D.S., Garban, G. & Garban, Z. (2003).** The anthocyanes: biologically-active substances of food and pharmaceutic interest. *The annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascical VI – Food Technology*, 106 – 115.
- Atawodi, S.E. (2005).** Antioxidant potential of african medicinal plants, *African Journal of Biotechnology*.4 (2), 128 – 133.
- Attia, F. (2007).** Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique et la maturité phénolique de la vigne *vitis vinifera L*: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. *Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse*, 194 p.
- Azuma, A., Kobayashi, S., Yakushiji, H., Yamada, M., Mitani, N. & Sato, A. (2007).** VvmybA1 genotype determines grape skin color, *Vitis*, 46 (3), 154 –155.
- Bahorun, T. (1997).** substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, 83 – 94.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H. & Buchbauer, G. (2008).** Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 108, 1122–1132.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005).** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Barbeau, G., Ramillon, D., Blin, A., Marsault, J. & Landure, J. (2005).** Effets combinés de l’enherbement et du porte greffe sur le comportement agronomique du *Cabernet franc* et du *Chenin*. Rôle du climat de l’année. In: *C.R. XIV GESCO*, Vol.2 Greisenheim- Allemagne. pp.155-160.
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiros, B., Ferreira, I.C.F.R. & Baptista, P. (2007).** Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 103, 413–419.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998).** The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-581.

- Bénard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., Weis, M. & Génard, M. (2009).** Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acides, ascorbate, carotenoids and phenolics compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4112 – 4123.
- Berli, F., D'angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R. & Silva, M.F. (2008).** Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar uv-b radiation levels by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2892–2898.
- Bisson, L. (2001).** In search of optimal grape maturity. *Practical winery and vineyard journal* du site <http://www.practicalwinery.com/julaug01p32.htm>, consulté le 13/04/2012 à 20H50.
- Bodin, F. & Morlat, R. (2006).** Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on soil depth – I. Validation of the water supply regime, phenology and vine vigour, in the Anjou vineyard (France). *Plant and Soil*, 281, 37 – 54.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D. & Robinson, S. P. (2006).** Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development, *Plant Physiology*, 140 (1), 279–291.
- Boss, P.K., Davies, C. & Robinson, S.P. (1996).** Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111, 1059-1066.
- Boukharta, M., Girardin, M. & Metche, M. (1994).** Procyanidols oligomeres des sarments de vigne, cepage Carignan. *Vitis* 33, 5-10.
- Brar, H.S., Singh, Z. & Swinny, E. (2008).** Dynamics of anthocyanin and flavonol profiles in the 'Crimson Seedless' grape berry skin during development and ripening. *Scientia Horticulturae*. 117 (4), 349-356.
- Breksa, A.P., Takeoka, G.R., Hidalgo, M.B., Vilches, A., Vasse, J. & Ramming, D.W. (2010).** Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry*, 121, 740–745.
- Brossaud, F., Cheynier, V., Asselin, C. & Moutounet, M. (1999).** Flavonoids compositional differences of grapes among site test planting of Cabernet franc. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (3), 277 - 284.
- Brzozowska, J. & Hanower, P. (1976).** Sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences), tome XII*.
- Bucchetti, B., Matthews, M.A., Falginella, L., Peterlunger, E. & Castellarin, S.D. (2011).** Effect of water deficit on Merlot grape tanins and anthocyanins across four seasons. *Scientia Horticulturae* 128, 297–305.
- Bucić-Kojić A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M. & Velić, D. (2011).** Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 195-199.

Bunea, C. I., Pop, N., Babeş, A.C., Matea, C., Dulf, F.V. & Bunea, A. (2012). Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal* 6 (66), 1 – 9.

Burin, VM., Falcão, I.D., Gonzaga, LV., Fett, R., Rosier, J.P. & Bordignon-Luiz, M.T. (2008). Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1027-1032.

Cadet, A. (2005). Le cépage *Vitis vinifera* L. cv. fer servadou : étude de la nutrition minérale et des relations cépage, terroir, qualité du vin. *Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse*, 316 p.

Cadot, Y., Minana-Castello, M.T. & Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9206 – 9215.

Cadot, Y. (2010). Quelles sont les teneurs en composés phénoliques de la baie. In « Le potentiel phénolique du Cabernet franc ». *INRA, Angers*, pp. 1/56p.

Cadot, Y., Chevalier, M. & Barbeau, G. (2011). Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1963–1976.

Cadot, Y. (2012). Communication personnelle.

Cadot, Y., Caillé, S., Samson, A., Barbeau, G. & Cheynier, V. (2012). Sensory representation of typicality of Cabernet franc wines related to phenolic composition: Impact of ripening stage and maceration time. *Analytica Chimica Acta*, 732 (30), 91–99.

Cann, R.L. & Wilson, A.C. (1983). Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 104, 699-711.

Carbonneau, A. (2004). Climat du vignoble et raisonnement de l'irrigation et de la conduite *Mondaviati, Bordeaux*, 109- 180.

Carrier, A. (2003). Que se passe--il dans le sol ? Serriculture maraîchère biologique. *Agriculture, Pêcherie et Alimentation, Québec*, 12p.

Castellarin, S.D. & Di Gaspero, G. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology*, 7, 46-55.

Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E. & Hermosin-Gutierrez, I., (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 992–1002.

Castillo-Munoz, N., Fernandez-Gonzalez, M., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E. & Hermosin-Gutierrez, I. (2009). Red-color related phenolic composition of Garnacha tintorera (*vitis vinifera* l.) grapes and red wines *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7883–7891.

- Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E. & Hermosin-Gutierrez, I. (2010).** Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 699–705.
- Cerpa-Calderon, F.K. & Kennedy, J.A. (2008).** Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9006–9014.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.M., Sarni-Manchado, P. & Fulcrand, H. (2006).** Structure and properties of wine pigments and tanins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 298-305.
- Cheynier, W., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Sarni, P. & Moutounet, M. (1998).** Stabilisation tanins – anthocyanes : données générales. Extrait de « Les composés phénoliques » Journée Technique (compte-rendu). *IPV-INRA*, 11p.
- Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C. & Teissèdre, P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin, article de synthèse. *Phytothérapie*, 6, 75–82.
- Choné, X., Van Leeuwen, C., Chéry, P. & Ribéreau-Gayon, P. (2001).** Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet sauvignon (*Vitis Vinifera*). Vegetative development, must and wine composition (example of Medoc Top Estate Vineyard, Saint Julien Area, Bordeaux, 1997). *South Africa Journal of Enology and Viticulture* 22, 8-15.
- CODEX STAN 247. (2005).** *Norme Générale Codex pour les Jus et les Nectars de Fruits*. Codex Alimentarius.
- Cohen, S.D., Tarara, J.M., Gambetta, G.A., Matthews, M.A. & Kennedy, J.A. (2012).** Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes. *Journal of Experimental Botany*, 63(7), 2655–2665.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Pires, D.A.C., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S. & Gerós, H. (2007).** Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1, 1-22.
- Cong, B., Liu, J.P. & Tanksley, S.D. (2002).** Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 99, 13606 - 13611.
- Cook-Papini, P., Mazza, G. Gatti, M. & Bavaresco, L. (2010).** Anthocyanin and aroma profiling of the 'Albarossa' grapevine crossbreed (*Vitis vinifera* L.) and its parent varieties 'Barbera' and 'Nebbiolo di Dronero'. *Vitis* 49 (3), 121–127.
- Coombe, B.G. & Hale, C.R. (1973).** The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology*, 51, 629-634.
- Cortell, J.M., Halbleib, M., Gallagher, A.V., Righetti, T.L. & Kennedy, J.A. (2007).** Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) Anthocyanins. 2. Anthocyanins and pigmented polymers in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6585-6595.

- Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.W. & Arnheim, N. (1992).** A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 7370-7374.
- CRAAQ. (2005).** Guide de référence en fertilisation. 1^{ère} édition, (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement). 15p.
- Crupi, P., Coletta, A. & Antonacci, D. (2010).** Analysis of carotenoids in grapes to predict norisoprenoid varietal aroma of wines from Apulia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9647–9656.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P. & Bogs, J. (2009).** The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 151, 1513–1530.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M. & Henriques, J.A.P. (2007).** Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2574–2580.
- Darrieumerlou, A., Geny, L., Broquedis, M. & Dochène, B. (2001).** Evolution de la composition en polyamines des baies de raisins au cours du processus d'infection par *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 40 (1), 11 –15.
- Davalos, A., Bartolomé, B. & Gomez-Cordovés. (2005).** Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93,325–330.
- De Freitas, V.A. P., Bourgeois, G. & Vitry, C. (1998).** Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, 49 (5), 1435-1441.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V. & Agabbio, M. (2004).** Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84, 99-105.
- Deloire, A., Carbonneau, A., Federspiel, B., Ojeda, H., Wang, Z. & Costanza, P. (2003).** La vigne et l'eau. *Progrès Agricole Viticole*, 120 (4), 79-90.
- Deloire, A., Vaudour, E., Carey, V., Bonnardot, V. & Van Leeuwen, C. (2005).** Grapevine responses to terroir: A global approach. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39, (4), 149-162.
- Deloire, A. (2008).** Raisin (1), Anatomie du raisin (*Vitis vinifera* L) : présentation de l'anatomie du raisin sous forme d'une fiche pédagogique.
- Demelin, E. (2012).** Le raisin et ses applications therapeutiques. *Thèse de Doctorat. Université de Limoges, Faculte de Pharmacie*, 194 p.
- Denisov, E.T. & Afanas'ev, I. B. (2005).** Antioxidants. In : «Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology». Ed. Taylor & Francis. pp. 849- 992.

- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., Laura La Neve, L. & Marco Giammanco, M. (2008).** The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45–49.
- Dokoozlian, N.K. & Kliewer, W.M. (1996).** Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 121(5), 869–874.
- Doss, A., Mohammed, Mubarak, H. & Dhanabalan, R. (2009).** Antibacterial activity of tanins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology* .2(2), 41 – 43.
- Dou, H., Jones, S., Obreza, T. & Rouse, B. (2005).** Influence of various phosphorus and potassium rates on juice vitamin c, β -carotene, lycopene and sugar concentrations of flame grapefruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 118, 372-375.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. & Robinson, S.P. (2003).** Synthesis of flavonols and expression of flavonols synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 110-121.
- Downey, M., Dokoozlian, N.K. & Krstic, M.P. (2006).** Cultural practice and environmental impacts on the flavonoids composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 257-268.
- Du, B., He, B.J., Shi, P.B., Li, F.Y., Li, J. & Zhu, F.M. (2012).** Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(17), 3381-3387.
- Dupuch, V. (1998).** Maturité phénolique et date de récolte : les apports de la méthode "CASV". Journée technique cinquanteenaire ITV France. Composés phénoliques – GAILLAC (Tarn).
- Dutta, D., Chaudhuri, U.R. & Chakraborty, R. (2005).** Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*. 4 (13), 1510-1520.
- Esna-Ashari, M., Gholami, M., Mohammad Ali Zolfigol, M.A., Shiri, M., Mahmoodi-Pour, A. & Hesari M. (2008).** Analysis of trans-resveratrol in Iranian grape cultivars by LC. *Chromatographia*, 67, 1017 – 1020.
- Fang, Y.Z., Yang, S. & Wu, G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872–879.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Fernandez, L., Pradal, M., Lopez, G., Berud, F., Romieu, C. & Torregrosa, L. (2006).** Berry size variability in *Vitis vinifera* L.. *Vitis*, 45, 53–55.
- Ferrer, M., Abella, J., Sibille, I., Camussi, G. & Gonzalez-Neves, G. (2003).** Determination of bud fertility as simple method for the determination of harvesting volume in

Vitis vinifera L. cv Tannat, using two pruning systems. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 37 (4), 199 – 211.

Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J.M., Moutounet, M. & Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tanins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7331-7338.

Frankel, E.N., Christine, A., Bosanek, C.A., Meyer, A.S., Silliman, K. & Kirk, L.L. (1998). Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 834–838.

Freedman, J.F., Parker C., Liqing, L., Perlman, J.A., Frei, B., Ivanov, V., Deak, L.R., Iafrafi, M.Z. & Folts, J.D. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 103:2792-2798.

Furiga, A., Lonvaud-Funel, A. & Badet, C. (2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry* 113, 1037–1040.

Génard, M., Robin, C., Gautier, H., Massot, C., Bénard, C., Larbat, R., Bertin, N., Le Bot, J., Adamowicz, S. & Bourgaud, F. (2010). Elaboration de la qualité du fruit : composition en métabolites primaires et secondaires. *Innovations Agronomiques* 9, 47-57.

Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B. & Kader, A.A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin c contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4976-4982.

Giovanelli, G. & Brenna, O. V. (2007). Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *European Food Research and Technology* , 225, 145–150.

Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1 - 13.

Gomez, C. (2009). Étude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes. *Thèse de Doctorat. Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques montpellier supagro-202p.*

Guerrero, F.G., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, A., García-Barroso, C. & Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112, 949–955.

Gurbuz, I., Yesilada, E. & Ito, S. (2009). An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 360-365

Habba, I.E., Abd El Aziz, N.G., Metwally, S.A. & Mazhar, A.A.M. (2013). Response of growth and chemical constituents in *khaya sengalensis* to salinity and gypsum under calcareous soil conditions. *World Applied Sciences Journal* 22 (4), 447-452.

Harris, J.M., Kriedemann, P.E. & Possingham, J.V. (1968). Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis*, 7, 106-109.

- Hernández-Jiménez, A., Gil-Muñoz, R., Ruiz-García, Y., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A. & Gómez-Plaza, E. (2013).** Evaluating the polyphenol profile in three segregating grape (*Vitis vinifera* L.) populations. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-9.
- Imre, S.P., Kilmartin, P.A, Rutan, T., Mauk, J.L. & Nicolau, L. (2012).** Influence of soil geochemistry on the chemical and aroma profiles of Pinot noir wines. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10 (2), 280-288.
- ITAF. (1993).** Conseils pratiques pour une plantation de vigne, (Institut Technique de L'Arboriculture Fruitière et de la Vigne), 8p.
- Ivanova, V., Stefova, M. & Chinnici, F. (2010).** Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 75 (1), 45–59.
- Jakobek, L., Seruga, M., Voca, S., Sindrak, Z. & Dobricevic, N. (2009).** Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 123, 23-28.
- Jayaprakash, G.K., Singh, R.P. & Sakariah, K.K. (2001).** Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1018-1022.
- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R. & Meunier, P. (1995).** The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis* 34 (2), 91-94.
- Jordão, A.M., Ricardo-da-Silva, J.M. & Laureano, O. (2001).** Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 40, 17-22.
- Jordão, A.M. & Correia, A.C. (2012a).** Relationship between antioxidant capacity, proanthocyanidin and anthocyanin content during grape maturation of Touriga nacional and Tinta roriz grape varieties. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 33 (2), 214 – 224.
- Jordão, A. M., Correia, AC. & Gonçalves, F. J. (2012b).** Evolution of antioxidant capacity in seeds and skins during grape maturation and their association with proanthocyanidin and anthocyanin content. *Vitis* (3), 137–139.
- Joseph, A.A., Shukitt-Hale, B. & Willis, L.M. (2009).** Grape Juice, berries, and walnuts affect brain aging and behavior. *The Journal of Nutrition*, 139, 1013 – 1017.
- Jourdes, M. (2003).** Réactivité, synthèse, couleur et activité biologique d'ellagitanins c-glycosidiques et flavano-ellagitanins. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux I-École Doctorale des Sciences Chimiques-* 215 p.
- Journal Officiel de la République Algérienne. (1989).** NA 301:jus de raisins: Spécification.

- Kader, A.A. (2002).** Pre-and postharvest factors affecting fresh produce quality, nutritional value, and implications for human health. *Proceeding of the International Congress Food production and the Quality of life, Sassari (Italy)*, 1, 109 – 119.
- Kallithraka, S., Mohdalya, A.A.A., Makris, D.P. & Kefalas, P. (2005).** Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis* . 18, 375–386.
- Kalt,W., Forney, C.F., Martin, A. & Prior, R. (1999).** Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 47, 4638–4644
- Keevil, J.G., Osman, H.E., Reed, J.D. & Folts, J.D. (2000).** Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *Journal of Nutrition*, 130, 53–56.
- Keller, M., Mills, L.J., Wample, R.L. & Spayd, S.E. (2005).** Cluster thinning effects on three deficit- irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56 (2), 91-103.
- Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.A., Ristic, R., Iland, P.G. & Jones, G.P. (2000a).** Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape & Wine Research*, 6, 244-254.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A. & Waterhouse, A.L. (2000b)** .Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55, 77-85.
- Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J. & Jones, G.P. (2001).** Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5348-5355.
- Kennedy, J.A. (2002).** Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard Journal*, 1 – 5.
- Kim, D.O., Jeong S. W. & Lee, C.Y. (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plum. *Food Chemistry*, 81, 321-326.
- Kim, S.K., Bae, R.N., Na, H., Dal Ko, K. & Chun, C. (2013).** Changes in physicochemical characteristics during fruit development in june-bearing strawberry cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(1), 44-51.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H. & Chen, W. (2010).** Optimization of extrctation of polyphenols from Sumac (*Rhus Coriaria* L.) and Chinese Sumac (*Rhus typhina* L.) Fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, 1 - 8.
- Kostova, I. (2005).** Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agentss*, 5, 29-46.
- Lafon-Lafourcade, S. & Guimberteau, G. (1962).** Evolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins. Station Agronomique et œnologique de Bordeaux (France). *Vitis*, 3, 130 – 135.

- Lancster, J.E., Lister, C.E., Reay, P.F. & Triggs, C.M. (1997).** Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122 (4), 594 – 598.
- Lee, S.K. & Kader, A.A (2000).** Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Lemieux, G. & Germain, D. (2002).** Le Bois Rameal Fragmenté: la clé de la fertilité durable du sol. *Ed. Groupe de coordination sur les bois Rameaux, Université Laval*
- Levine, R.L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* , 32, 790-796.
- Leyva, A., Jarrillo, J.A., Salinas, J. & Martinez-Zapater, M. (1995).** Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in light-dependent manner. *Plant Physiology*, 108, 39–46.
- Liang, N.N., He, F., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J. & Duan, C.Q. (2012).** Optimization of Sample preparation and phloroglucinol analysis of marselan grape skin proanthocyanidins using HPLC-DADE SI-MS/MS. *Southe Africa Journal of Enology and Viticulture*, 33 (1), 122 – 131.
- Iońska-Ryś, E.J., Zalewska-Korona, M. & Kalbarczyk, J. (2009).** Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(2), 115-120.
- Lorrain, B., Chira, K. & Teissedre, P.L. (2011).** Phenolic composition of Merlot and Cabernet sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry* 126, 1991–1999.
- Lu, Y., Zhang, C., Bucheli, P. & Wei, D. (2006).** Citrus flavonoids in fruit and traditional chinese medicinal food ingredients in China. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 57-65.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Jay-Allemand, C. (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216 : <http://books.google.com> (consulté le 18 /11/2011).
- Makris, D.P., Kallithraka, S. & Kefalas, P. (2006).** Flavonols in grapes, grape products and wines : burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 396-404.
- Mane, A. V., Saratale, G. D., Karadge, B. A. & Samant, J. S. (2011).** Studies on the effects of salinity on growth, polyphenol content and photosynthetic response in *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23 (1), 59-70.
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M. (2005).** Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40 (3), 255-260.
- Marquez, A., Dueñas, M., María P. Serratos, M.P. & Merida, J. (2013).** Identification by HPLC-MS of Anthocyanin Derivatives in raisins. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-8.

- Mateus, N., Proença, S., Rebeiro, P., Machado, J.M. & De Freitas, V. (2001).** Grape and wine polyphenolic composition of red vitis vinifera varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y tecnologia alimentaria*, 3, 102 – 110.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. & Velasco, R. (2006).** Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692 - 7702.
- Matus, J.T., Loyola, R., Vega, A., Pena-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P. & Alcalde, J.A. (2009).** Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 853–867.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V. & Moutounet, M. (2003).** Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 105 – 111.
- May, P. (2000).** From bud to berry, with special reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 82–98.
- Mélo, E.A., Lima, V.L.A.G., Maciel, M.I.S., Caetano, A.C.S. & Leal, F.L.L. (2006).** Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9(2), 89-94.
- Mink, P.J., Scrafford, C.G., Barraij, L.M., Harnack, L., Hong, C.P., Nettleton, J.A. & Jacobs, D.R. (2007).** Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 895–909.
- Mizuno, H., Hirano, K. & Okamoto, G. (2006).** Effect of anthocyanin composition in grape skin on anthocyanic vacuolar inclusion development and skin coloration. *Vitis*, 45, 173-177.
- Moriarty, J.M., Harmon, R., Weston, L.A., Bessis, R., Breuil, A.C., Adrian, M. & Jeandet, P. (2001).** Resveratrol content of two Californian table grape cultivars. *Vitis*, 40 (1), 43 - 44.
- Morlat, R. & Bodin, F. (2006).** Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on soil depth – II. Validation of the grape yield and berry quality in the Anjou vineyard (France). *Plant and Soil*, 281, 55–69.
- Mulero, J., Pardo, F. & Zafrilla, P. (2010).** Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 569–574.
- Muñoz, S., Mestres, M., Busto, O. & Guasch J. (2008).** Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta*, 628, 104 – 110 (*Abstract*).
- Naczka, M., Shahidi, F. & Sullivan, A., Shahidi, F. (1992).** recovery of rapeseed tanins by various solvent systems. *Food Chemistry*, 45 (1), 51–54. (*Abstract*).

- Naczka, M. & Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Review, Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.
- Navarro, J.M., Flores, P., Garrido, C. & Martinez, V. (2006).** Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96, 66–73.
- Nickavar, B., Alinaghi, A. & Kamalinejad, M. (2008).** Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 203–209.
- Njoku, P. C., Ayuk, A. A. & Okoye, C. V. (2011).** Temperature effects on vitamin C content in citrus fruits. *Pakistan Journal of Nutrition* 10 (12), 1168–1169.
- Nunez, V., Gomez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Hong, Y.J. & Mitchell, A.E. (2006).** Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 915–921.
- O’Byrne, D.J., Devaraj, S., Grundy, S.M., & Jialal, I. (2002).** Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1367–74.
- Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., Lopez-Solis, R., Zamora-Marin, F., Ricardo-Da Silva, J.M. & Laureano, O. (2010).** Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3591–3599.
- Oliveira, C., Silva Ferreira, A.C., Mendes Pinto, M., Hogg, T., Alves, F. & Guedes De Pinho, P. (2003).** Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5967–5971.
- Oliveira, C., Barbosa, A., Silva Ferreira, A.C., Guerra, J. & De Pinho, P.G. (2006).** Carotenoid profile in grapes related to aromatic compounds in wines from Douro region. *Journal of Food Science*, 71(1), 1–7.
- Ó-Marques, J., Reguinga, R., Laureano, O. & Ricardo-da-Silva, J.M. (2005).** Changes in grape seed, skin and pulp condensed tanins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 20 (1), 35–52.
- Orak, H.H. (2007).** Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, 111, 235–241.
- Pham-Huy, L.A., He, H. & Chuong Pham-Huyc, C. (2008).** Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2), 89–96.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R. & Defraigne, J.O. (1998).** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi-Sphere*. 73, 1–4.

- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M.J. & Nicoli, M.C. (2004).** Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1177–1180.
- Possner, D.R.E. & Kliever, W.M. (1985).** The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*, 24, 229-240.
- Prvulović, D., Malenčić, D., Popović, M., Ljubojević, M. & Ognjanov, V. (2011).** Antioxidant properties of sweet cherries (*Prunus avium* L.) - role of phenolic compounds. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 59, 1149 – 1152.
- Renouf, V. (2006).** Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres – relation avec la qualité du vin. *Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse*, 190 p.
- Revilla, E. & Ryan, J.M. (2000).** Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881, 461–469.
- Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G. & Ryan, JM. (2001).** Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915, 53–60.
- Revilla, E., Carrasco, D., Carrasco, V., Benito, A. & Arroyo-García, R. (2012).** On the absence of acylated anthocyanins in some wild grapevine accessions. *Vitis* 51 (4), 161–165.
- Reza Amirjani, M. (2010).** Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *EJBS*, 3 (1), 06-16.
- Richter, C., Park, J.W. & Ames, B.N. (1988).** Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 6465-6467.
- Río Segade, S., Orriols, I., Gerbi, V. & Rolle, L. (2009).** Phenolic characterization of thirteen red, grape cultivars from galicia by anthocyanin profile and flavanol composition. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 43 (4), 189-198.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sanchez, E. & Romero, L. (2001).** Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160, 315–321.
- Roby, G. & Matthews, M.A. (2004).** Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 10, 74-82.
- Roby, G., Harbertson, J. F., Adams, D. A. Matthews, M.A. (2004).** Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tanins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 100 - 107.

- Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., de Souza Schmidt Gonçalves, A.E., Genovese, M.I. & Fett, R. (2011).** Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44, 897–901.
- Rodriguez-Amaya, B.D. (2001).** A guide to carotenoid analysis in foods. *International Life Sciences Institute Press*, 1-71.
- Rodriguez-Amaya, D.B. & Kimura, M. (2004).** Harvestplus handbook for carotenoid analysis. *Edition: Technical Monograph Series 2*. pp 2-51.
- Roggero, J.P., Archier, P. & Coen, S., (1992).** Etude par CLHP des compositions phénolique et anthocyanique d'un moût de raisin en fermentation. *Sciences des Aliments* 12, 37-46.
- Rose, R.C. & Bode, A.M. (1993).** Biology of free radical scavengers : an evaluation of ascorbate. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 7, 1135-1142.
- Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J. & Jiang, Y. (2008).** effects of various temperatures and ph values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*. 9, 1333-1341.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., De Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. & Mancini-Filho, J. (2010).** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002.
- Sannomiya, M., Fonseca, V.B., Da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., Dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Souza, A.R.M. & Vilegas, W. (2005).** Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 1–6.
- Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M. & Toth-Markus, M. (2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*. 38, 1023-1029.
- Schreiner, M. & Huyskens-Keil, S. (2006).** Phytochemicals in Fruit and Vegetables: Health Promotion and Postharvest Elicitors. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 267–278.
- Sharique, A. & Beigh, S.H. (2009).** Ascorbic acid, carotenoids, total phenolic content and antioxidant activity of various genotypes of *Brassica Oleracea encephala*. *Journal of Medical and Biological Sciences*, 3 (1).
- Shi, J., Jianmel Yu, J., Pohorly, J.E. & Kakuda, Y. (2003).** Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *Journal of medicinal food*, 6 (4) 291–299.
- Souquet, J.M., Cheynier ,V., Brossaud, F. & Moutounet, M. (1996).** Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43 (2), 509 - 512.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M. Mee, D.L. & Ferguson, J.C. (2002).** Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (3), 171-182.

- Spranger, I., Sun, B., Mateus, A.M., De Freitas, V. & Ricardo-Da-Silva, J.M. (2008).** Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry* 108, 519–532.
- Stefanovits-Bányai, É., Tulok, M.H., Hegedűs, A., Renner, C. & Varga, I.S. (2003).** Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*, 47, 111-113.
- Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M. & Spranger, M.I. (2001).** Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência e Técnica Vitivinícola* . 16, 23-34.
- Sun, B.S. & Spranger, M.I. (2005).** Review: quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência e Técnica Vitivinícola* . 20 (2), 59-89.
- Tanguy, M. & Begué-Simon, A.M. (2009).** Les antioxydants dans l'alimentation. *STRATÉGIES, Mise au point. Médecine* 256 – 260.
- Tarrara, J.M., Lee, J., Spayd, S.E. & Scagel, C-F. (2008).** Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*. 59 (3), 235 – 247.
- Tonietto, J. & Carbonneau, A. (2002).** Régime thermique en période de maturation du raisin dans le géoclimat viticole. Indice de fraîcheur des nuits – IF et amplitude thermique In : *CR IV Symp. Inter. Sur le zonage viticole. Avignon – France*, 279 – 289.
- Tregoat, O., Van Leeuwen, C., Choné, X. & Gaudillère, J.P. (2002).** Etude du régime hydrique et de la nutrition azotée de la vigne par des indicateurs physiologiques. Influence sur le comportement de la vigne et la maturation du raisin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 133-142.
- Ubalde, J.M., Sort, X., Zayas, A. & Poch, R.M. (2010).** Effects of soil and climatic conditions on grape ripening and wine quality of Cabernet sauvignon, *Journal of Wine Research*, 21(1), 1-17.
- Van Leeuwen, C. & Seguin, G. (2006).** The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17 (1), 1–10.
- Van Leeuwen, C. & Vivin, P. (2008).** Alimentation hydrique de la vigne et qualité des raisins. *Innovations Agronomiques*, 2, 159-167.
- Veluri, R., Singh, R.P., Liu, Z., Thompson, J.A., Agarwal, R. & Agarwa, C. (2006).** Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27(7), 1445–1453.
- Verries, C., Guiraud, J.L., Souquet, J.M., Vialet, S., Terrier, N. & Olle, D. (2008).** Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5896-5904.

Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N. & Nonier, M.F. (2003). Sur l'estimation et la quantification des composés phénoliques des vins. *Bulletin O.I.V.*, 76, 281-303.

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A. & Warid, K. (2012). effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 675-682.

Yang, J., Martison, T.E. & Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

Yi, O.S., Meyer, A.S. & Frankel, E.N. (1997). Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1301-1307.

Yoro, G. & Godo, G. (1990). Les méthodes de mesure de la densité apparente Analyse de la dispersion des résultats dans un horizon donné. *Cah. ORSTOM, séries Pédologie*, 25 (4), 423-429.

Zhang, C., Tanabe, K., Wang, S., Tamura, F., Yoshida, A. & Matsumoto, K. (2006). The impact of cell division and cell enlargement on the evolution of fruit size in *Pyrus pyrifolia*. *Annals of Botany*, 98, 537-543.

Zhu, L., Zhang, Y. & Lu, J. (2012). phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3492-3510.

Ziadi, N., & Sen Tran, T. (2006). Lime Requirement. In soil sampling and methods of analysis, pp 155 – 160. Deuxième édition, Taylor & Francis Group, LLC.

Sites internet :

www.gifruit.com : consulté le 13 – 07 – 2013

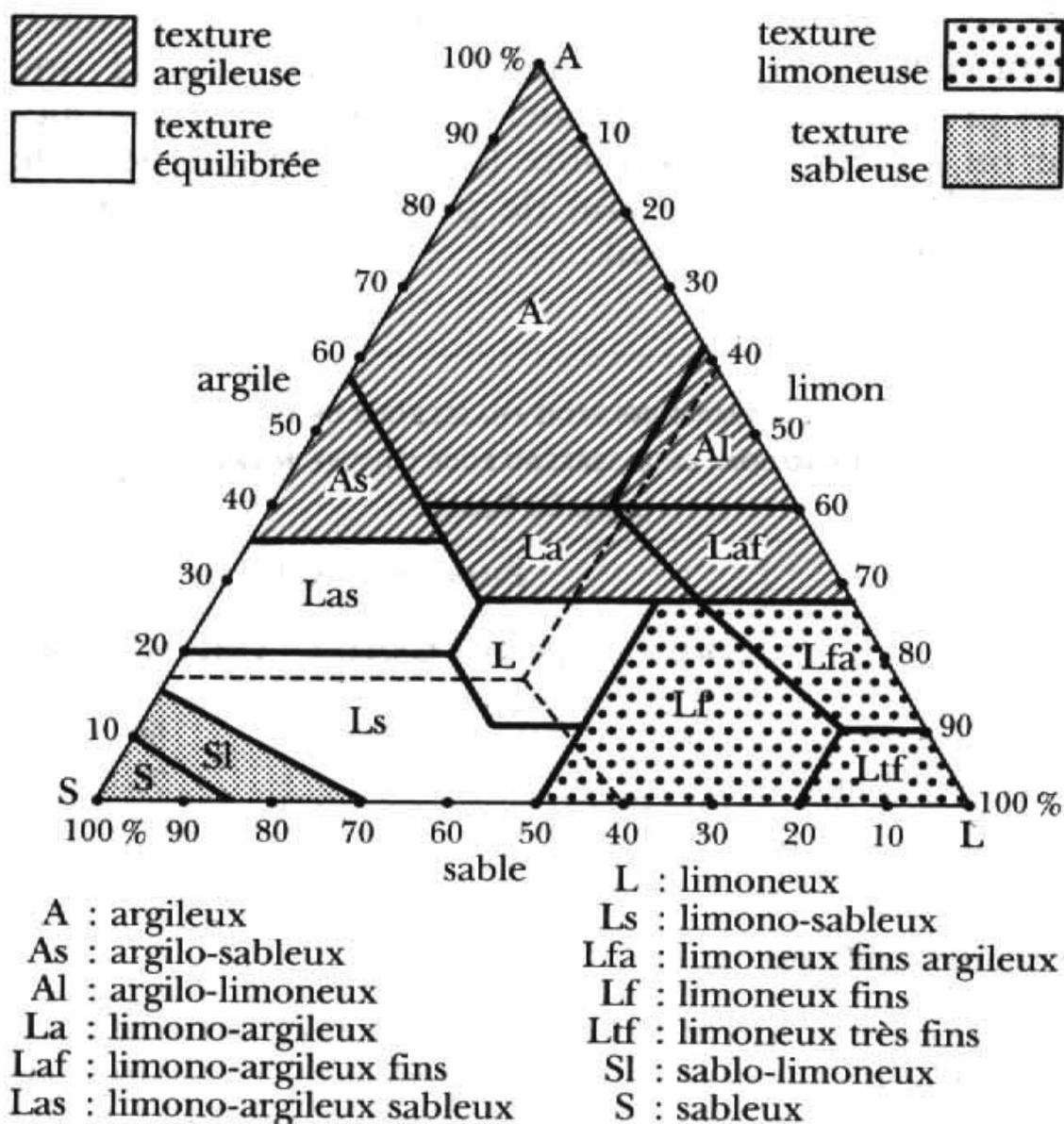
<http://faostat.fao.org>: consulté le 18 – 07 – 2013 (23H28)

<http://www.lano.asso.fr/>: consulté mercredi 09/10/13 à 11H26

<http://www.practicalwinery.com/julaug01p32.htm>: consulté le 13/04/2012 à 20H50.

Annexes

ANNEXE 1 : Triangle textural



TRIANGLE DES TEXTURES
(d'après U.S. département of agriculture)

ANNEXE 2 : Publications

Benmeziane, F., Djamai, R., Cadot, Y. & Seridi, R.2014. Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*). *International Food Research Journal*, 21(3): 1061-1065.

Benmeziane, F., Djamai, R. & Cadot, Y. R.2014. Antioxidant capacity, total phenolics, carotenoids, and vitamin c contents of five varieties of table grape from Algeria and their correlations. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2014 (48) : 153-162.

ANNEXE 3 : Tableau des temps de rétention de différents composés polyphénoliques identifiés dans les extraits des pellicules et des pépins des cinq variétés de raisin analysées

Composés	Temps de rétention (min)
Anthocyanines	
1 Delphinidine-3- <i>O</i> -glucoside (Dp3glc)	5.809 ± 0.083
2 Cyanidine-3- <i>O</i> -glucoside (Cn3glc)	7.426 ± 0.124
3 Petunidine-3- <i>O</i> -glucoside (Pt3glc)	8.600 ± 0.124
4 Paeonidine-3- <i>O</i> -glucoside (Pn3glc)	10.646 ± 0.147
5 Malvidine-3- <i>O</i> -glucoside (Mv3glc)	11.693 ± 0.141
6 Petunidin-3-acetylglucoside (Pt3Acglc)	16.829 ± 0.072
7 Delphinidin -3- <i>p</i> -coumaroylglucoside (Dp3Cmglc)	19.432 ± 0.196
8 Peonidin-3-acetylglucoside (Pn3Acglc)	19.316 ± 0.133
9 Malvidin-3-acetylglucoside (Mv3Acglc)	20.403 ± 0.157
10 Cyanidin-3- <i>p</i> -coumaroylglucoside (Cn3Cmglc)	21.759± 0.246
11 Petunidin -3- <i>p</i> -coumaroylglucoside (Pt3Cmglc)	22.800 ± 0.185
12 Malvidine aglycone (MvAgly)	23.412 ± 0.145
13 Peonidin-3- <i>p</i> -coumaroylglucoside (Pn3Cmglc)	25.387 ± 0.228
14 Malvidin-3- <i>p</i> -coumaroylglucoside (Mv3Cmglc)	25.949 ± 0.217
Flavonols	
15 Myricétol	10.236 ± 0.064
16 Quercétol cis	13.526 ± 0.261
17 Quercétol trans	14.069 ± 0.249
18 Kaemférol	17.616 ± 0.277
19 Isorhamnétol	18.629 ± 0.195
Proanthocyanidines	
20 Catéchine (C)	8.100 ± 0.079
21 Epicatéchine (EC)	9.112 ± 0.075
22 Epicatéchine-3- <i>O</i> -Gallate (ECG)	11.609 ± 0.129
EI Etalon interne (EI)	15.006 ± 0.127
23 Epigallocatechine-SH (EGC-SH)	18.263 ± 0.129
24 Catechine-SH (C-SH)	20.822 ± 0.136
25 Epicatechine-SH (EC-SH)	21.563 ± 0.134
26 Epicatéchine-3- <i>O</i> -Gallate-SH (ECG-SH)	23.725 ± 0.128