

## IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DU RAISIN CHATEAU KSARA

Anthony Ojeil, Nada El Darra, Youssef El Hajj, Paulette Bou Mouncef<sup>1</sup>, Toufic J. Rizk<sup>2</sup>  
et Richard G. Maroun

Laboratoire de Biochimie cellulaire, Département des Sciences de la Vie et de la Terre,  
Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Liban

<sup>1</sup> Château KSARA, s.a.l, Ksara, Békaa, Liban

<sup>2</sup> Centre d'analyses et de recherche, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Liban  
rmaroun@fs.usj.edu.lb

(Received 14 April 2010 - Accepted 20 May 2010)

### RESUME

*Un bon nombre d'études relève le fait que les composés phénoliques présents dans une grande variété de fruits et de légumes manifestent des activités antioxydantes et antiradicalaires qui seraient à l'origine de la réduction de risques de développement de plusieurs pathologies comme les cancers et les maladies cardiovasculaires.*

*Dans ce travail, on a étudié ces propriétés sur des extraits phénoliques obtenus à partir de différentes variétés de raisins cultivées dans la plaine de la Békaa au Liban dans les domaines de plantation des vignes Château KSARA. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP), les études qualitatives et quantitatives au DPPH (2,2-diphényl-picrylhydrazyl), les méthodes Folin-Ciocalteu, FTC (thiocyanate de fer) et l'endommagement de l'ADN par des agents altérants furent utilisés. Les extraits de composés phénoliques utilisés dans notre étude ont montré un effet chélateur des radicaux libres et ce qualitativement et quantitativement. Il a été également démontré qu'ils réduisent l'oxydation des acides gras polyinsaturés provoquée par l'exposition de ces derniers à une température de 40°C pendant trois jours. Finalement, il fut prouvé que ces composés phénoliques bloquent la dégradation de l'ADN induite in vitro par des agents altérants tel que le peroxyde d'hydrogène.*

**Mots clés:** composés phénoliques, antioxydant, antiradicalaire, dégradation de l'ADN, CLHP

### ABSTRACT

*Several studies reveal that phenolic compounds present in a wide variety of fruits and vegetables exhibit antioxidant and antiradical properties which would be the main cause of reducing the risk of developing several pathologies such as cancer and cardiovascular diseases.*

*In this study, the analysis of these properties on the phenolic extracts obtained from different varieties of grapes grown in the Bekaa valley in Lebanon in the vineyard of Château KSARA have been conducted.*

*HPLC (High performance liquid chromatography), Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl), and FTC (ferric thiocyanate) methods as well as the DNA degradation assay were used. The obtained extracts clearly showed antioxidant and antiradical activities. Phenolic compounds reduced the oxidation of polyunsaturated fatty acids caused by their storage at 40°C for up to three days and inhibited in vitro DNA degradation induced by hydrogen peroxide.*

**Keywords:** phenolic compounds, antioxidant, antiradical properties, DNA degradation, HPLC

## INTRODUCTION

L'importance des composés phénoliques dans la viticulture et l'œnologie est bien connue (Flanzy, 1998). Ce sont des substances naturellement présentes dans les fruits, les légumes, les graines, les fleurs et aussi les herbes où ils contribuent à la couleur et aux propriétés sensorielles telles que l'amertume et l'astringence (Ribéreau-Gayon, 1964 ; Pincemaila *et al.*, 2007). Les composés phénoliques sont des précurseurs des phénols volatils, qui enrichissent les vins avec différents arômes. Ils sont également responsables de réactions de brunissement du vin et sont considérés comme des éléments essentiels lors de la conservation et le vieillissement (Vivas *et al.*, 1998). Dans les raisins, les composés phénoliques sont des métabolites secondaires trouvés dans la peau, les graines et la chair et sont extraits dans les vins lors de la vinification (Brat *et al.*, 2007). Les types et les concentrations de ces composés dépendent d'un certain nombre de facteurs: le stade de maturation, le sol, les conditions climatiques, la culture de la vigne et le traitement auquel elle est soumise (Bautista-Ortin *et al.*, 2007). En outre, chaque variété de raisin présente une composition différente en composés phénoliques. Ainsi, le suivi de cette évolution au cours de la maturation du raisin est très informatif et utile (Pérez-Magariño & Gonzalez-San, 2006 ; Guyot & Duprazi, 2004).

En plus de leur rôle important dans certaines propriétés sensorielles, plusieurs études ont souligné que beaucoup d'entre eux montrent des activités biologiques liées à leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires (Kanner *et al.*, 1994 ; Vinson & Hontz, 1995). Grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres oxygènes en particulier les radicaux peroxydes (ROO<sup>•</sup>), alkoxyles (RO<sup>•</sup>), superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) et les hydroxyles (OH), générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections...) (Min & Ebeler, 2008 ; Subirade *et al.*, 1995). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels permet à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies, ce qui suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Weiguang *et al.*, 2005), des maladies inflammatoires (Aruoma, 1994), cardiovasculaires (Stoclet *et al.*, 2004 ; Scalbert & Williamson, 2000 ; Leifert & Abeywardena, 2008) et neurodégénératives (Ramassamy, 2006).

Après la procuration de plusieurs échantillons, de différents cépages et de plusieurs parcelles obtenus à différentes dates de maturation et cultivés dans les terroirs de Château KSARA dans la vallée de la Békaa, il s'agissait d'extraire les composés phénoliques présents

dans la pellicule, puisque ces derniers se concentrent le plus dans la peau du raisin (Vivas *et al.*, 1998).

L'extraction faite, en présence de solvant organique, il fut utile dans un premier temps d'analyser les extraits afin de les caractériser, de les quantifier et d'étudier la concentration des composés phénoliques totaux (CPT) ce qui permettra par la suite de classer les variétés de raisin selon leurs types et concentrations en composés phénoliques. Sachant que notre travail se base sur l'étude des extraits phénoliques totaux des raisins cette classification permettra donc d'établir un lien direct entre la composition en molécules phénoliques et les propriétés bioactives de chaque extrait.

Les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des extraits ont ensuite été analysées en les incubant (i) en présence de radicaux libres et en analysant leur pouvoir chélateur, (ii) en présence d'acides gras et en étudiant leur oxydation provoquée volontairement par augmentation de la température, (iii) en présence d'agents altérant l'ADN.

Il est à noter que cette étude sur les propriétés fonctionnelles des composés phénoliques est très originale à l'échelle libanaise. Elle est la première faite sur des cépages cultivés dans ce pays. L'ensemble des résultats devra permettre de mieux comprendre les relations qui existent entre la composition phénolique et la qualité des produits consommés tel le raisin, le jus de raisin ou bien le vin.

## MATERIELS ET METHODES

### Préparation des extraits et stockage

Les composés phénoliques sont extraits à partir de la pellicule de différentes variétés de raisin, cueillies à différentes dates et de différentes parcelles. Pour chaque variété, 5g de pellicule furent incubés avec 10mL d'un mélange méthanol - acide formique (95 :5), (Scharlau Chemie S.A, Espagne) pendant 3 jours (Revilla *et al.*, 2001). Les extraits ont été ensuite transférés dans de nouveaux tubes et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

**Quantification des composés phénoliques totaux par la méthode Folin-Ciocalteu** (Hogan *et al.*, 2009 ; Segade *et al.*, 2008 ; Waterhouse, 2001)

**Préparation de la gamme étalon :** A partir d'une solution standard d'acide gallique (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) de 5 g/l (10% Ethanol (Scharlau Chemie S.A, Espagne)), les dilutions suivantes ont été préparées : 0 mg/L Equivalent Acide Gallique (GAE), 50 mg/L GAE, 100 mg/L GAE, 150 mg/L GAE, 250 mg/L GAE et 500 mg/L GAE.

**Dosage des composés phénoliques par la méthode Folin-Ciocalteu :** 1,58 mL d'eau distillée furent mélangés à 10 µL d'échantillon ou de l'une des concentrations de la gamme étalon, 100 µL du réactif Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) furent finalement ajoutés. Le mélange obtenu a été laissé 5 minutes à température ambiante puis 300 µL de la solution saturée en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Fluka, Allemagne) ont été ajoutés. Le tout incubé à 20°C pendant 2 heures. L'absorbance a été lue à 765 nm.

### **Caractérisation des extraits par CLHP (chromatographie liquide à haute performance)** (Ho *et al.*, 1999)

Trois échantillons ont été sélectionnés : Syrah, Tal Dnoub, 16/08/02 ; Cabernet Sauvignon, Tanail, 20/09/02 et Cabernet Sauvignon, Tanail, 26/09/02.

Vingt µl d'extraits ont été analysés sur un système de Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (KNAUER, Allemagne). L'analyse des chromatogrammes a été réalisée à l'aide du programme ChromGate version 2.8 (KNAUER, Allemagne). Les composés phénoliques ont été séparés sur une colonne Spherisorb S5 ODS2 250mm x 4.6mm (Alltech, USA) mise dans un four à colonne (Column oven, KNAUER, Allemagne) à une température réglée à 25°C. Les chromatogrammes obtenus à 280, 320 et 550nm (DAD K2800, KNAUER, Allemagne) ont été comparés à ceux obtenus sur des standards de composés phénoliques connus à savoir : acide sinapique, acide caféique, acide chlorogénique, acide ferrulique, gallate de catéchine, resveratrol, acide hydroxybenzoïque, catéchine, épicatechine, épigallocatechine, galocatechine, prodelpinidine, kaempférol, quercétol, myricétol et rutine (Sigma-Aldrich). Le gradient de séparation était formé par deux solvants A et B. **Solvant A** : H<sub>2</sub>O 98% et acide formique 2%. **Solvant B** : méthanol 69%, H<sub>2</sub>O 29 % et acide formique 2%.

### **Etude des propriétés antiradicalaires par le test au DPPH (2,2-Diphényl-picrylhydrazyl)**

**Méthode qualitative : chromatographie sur couche mince de silice** (Huang *et al.*, 2005)

Parmi les différents échantillons quantifiés par la méthode de Folin-Ciocalteu, quinze échantillons présentant les meilleures concentrations en composés phénoliques totaux ont été dilués dans de l'éthanol pur (Merck, Allemagne) à 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,05 et 0,01 mg/mL (Tableau 1).

**Contrôles positifs** : Le BHT et le Resveratrol (Sigma Chemical Co., USA), ont été utilisés comme contrôles positifs aux mêmes concentrations, le premier étant un antioxydant synthétique et le second un antioxydant naturel.

**Dépôt des échantillons** : Les aliquots (10µL d'échantillon ou de contrôles positifs) ont été déposés sur la plaque de silice. Après séchage, la plaque a été complètement trempée dans un bac contenant une solution de DPPH (0,4 mM, Sigma Chemical Co., Etats-Unis), puis relevée 10 secondes après le trempage, posée sur du papier filtre (Whatman) et finalement séchée. Des taches blanches apparaissent reflétant le pouvoir antiradicalaire.

**Méthode quantitative** (Wu *et al.*, 2005) : Les quinze échantillons sélectionnés ont été dilués dans de l'éthanol pur à différentes dilutions 50 - 10 - 5 et 1 mg/mL.

**Contrôles positifs** : une solution de 1 mg/mL de contrôles positifs (BHT ou Resveratrol) a été préparée.

**Dosage quantitatif au DPPH des composés phénoliques totaux** : 450 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) sont versés dans un tube Eppendorff de 2 mL. 50 µL des échantillons à étudier ou des contrôles (concentration connue) ont été ajoutés au tampon. 1,5 mL de la solution de DPPH à 0,1 mM (Sigma Chemical Co., Etats-Unis), ont été ajoutés au mélange. Le tout a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc préparé avec du méthanol pur.

**Evaluation des propriétés antioxydantes : méthode du thiocyanate de fer (FTC)**  
(Markowicz *et al.*, 2006)

Les quinze échantillons sélectionnés ont été dilués dans de l'éthanol pur à une dilution de 0,1 mg/mL.

**Contrôles positifs** : Une solution de 1 mg/mL de contrôles positifs (BHT ou Resveratrol) a été préparée. Un contrôle négatif a été également préparé contenant tous les réactifs à l'exception des composés phénoliques totaux ou l'agent antioxydant.

**Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques** : A 3,9 mL d'eau distillée, 4 mL d'extraits ou de contrôles positifs sont ajoutés à une concentration de 0,1 mg/mL. 4 mL d'émulsion d'acide linoléique à 2,52% (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) et 8 mL de tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 0,05M, pH 7 (Scharlau, Espagne) sont respectivement ajoutés. Le mélange a été placé après agitation au four à 40°C dans l'obscurité. Une heure après l'incubation, 9,7 mL d'éthanol à 75% (Merck, Allemagne), 0,1 mL de thiocyanate d'ammonium à 30% (Fluka, Allemagne) et 0,1 mL des solutions incubées sont mélangés avec 0,1 mL de Chlorure de fer II ( $\text{FeCl}_2$ ) à 0,02 M (Fluka Allemagne). L'absorbance est mesurée à 500 nm exactement 3 minutes après l'ajout de  $\text{FeCl}_2$ . Toutes les 24 heures, les 5 dernières étapes de la manipulation sont répétées et ce jusqu'à 72 heures.

**Méthode de l'altération de l'ADN** (Kitts *et al.*, 1999)

Les cinq échantillons présentant le meilleur pouvoir antioxydant et antiradicalaire ont été dilués dans de l'éthanol pur à deux différentes dilutions : 100 mg/L et 1 µg/mL

Les mélanges réactionnels ont été préparés avec du tampon phosphate  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 9mM, pH 7,4 (Scharlau Espagne),  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,02 g/L,  $\text{FeSO}_4$  à 3mM (Scharlau, Espagne), EDTA à 5,5 mM (Scharlau, Espagne), 2 µL de composés phénoliques (des différents échantillons aux deux différentes dilutions) et 0,2µg d'ADN (plasmide pBR 322 à 0,2 mg/mL (Fermentas, Canada)). Le tout est incubé pendant 1 heure à 37°C.

Un gel à 0,7% d'agarose et 0.625 mg/mL de bromure d'éthidium a été coulé. 5 µL de tampon de charge (0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol, 50% glycérol et 200mM Tris HCl pH 7.5) ont été ajoutés à chaque tube. La migration a eu lieu pendant 2 heures à 50 V. Les bandes d'ADN ont été finalement visualisées sous UV.

**RESULTATS ET DISCUSSION****Quantification et caractérisation des composés phénoliques**

La méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée pour le dosage des composés phénoliques totaux. L'ensemble de ces composés est oxydé par le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier, de couleur orange, est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques et possède une absorption maximale aux environs de 750 nm (Waterhouse, 2001).

Le test de Folin-Ciocalteu a permis de sélectionner les 15 échantillons présentant la concentration la plus élevée en composés phénoliques parmi les 60 échantillons qui ont été stockés (Tableau 1).

**TABLEAU 1**

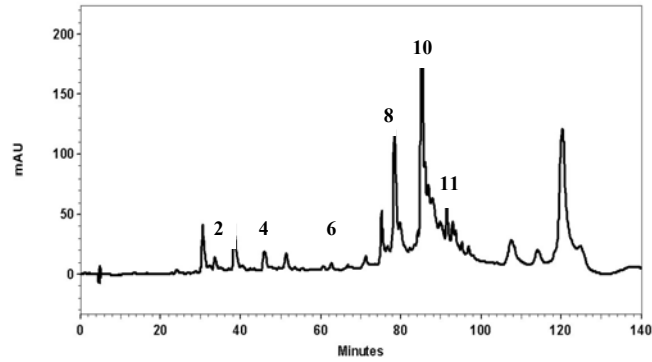
**Echantillons de Raisins Sélectionnés pour l'Etude des Propriétés Antioxydantes avec leurs Concentrations en CPT**

<u>Echantillon</u>	<u>Cépage</u>	<u>Parcelle</u>	<u>Date de l'échantillonnage</u>	<u>Concentrations [mg/L]</u>
1	Merlot	Kanafar	19.09.02	916
2	Merlot	Hsein Zoghbi	22.08.02	839
3	Merlot	Hsein Zoghbi	11.09.02	1034
4	Merlot	Tal Dnoub	10.09.02	869
5	Merlot	Tal Dnoub	03.09.02	894
6	Merlot	Joseph Khoury	04.09.02	903
7	Cabernet Sauvignon	Elias Estephan	16.09.02	950
8	Cabernet Sauvignon	Kanafar	19.09.02	901
9	Cabernet Sauvignon	Joseph Khoury	13.09.02	1079
10	Sauvignon	Kanafar	10.09.02	614
11	Chardonnay	Kanafar	27.08.02	690
12	Syrah	Youssef Hanna	20.09.02	844
13	Syrah	Youssef Hanna	09.09.02	924
14	Syrah	Tal Dnoub	05.09.02	894
15	Syrah	Kanafar	19.09.02	857

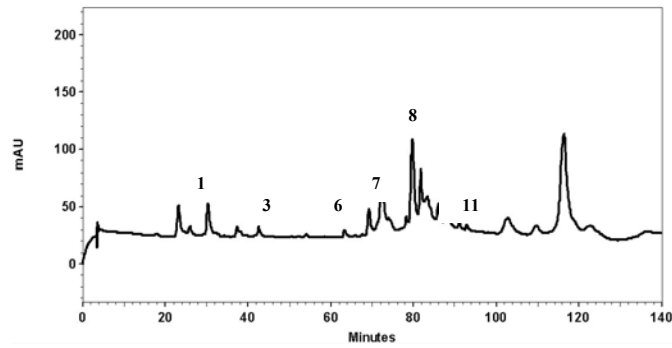
Le Tableau 1 montre que les variétés rouges de raisins sont celles les plus concentrées en composés phénoliques (Merlot, Cabernet Sauvignon et Syrah), alors que les variétés blanches y sont moins (Sauvignon et Chardonnay), ce qui est en parfait accord avec la littérature (Flanzy, 1998).

**Analyse des composés phénoliques par CLHP (chromatographie liquide à haute performance)**

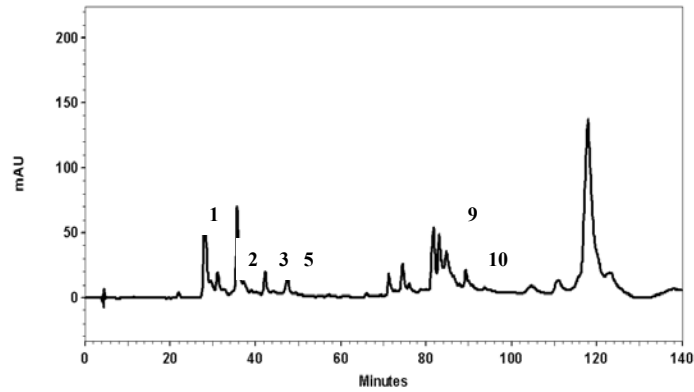
Dans le but de démontrer l'efficacité de la technique CLHP dans la détection et la quantification des composés phénoliques des extraits, on a analysé, à titre indicatif, trois échantillons pris au hasard (Figure 1). Les composés phénoliques de ces échantillons ont été séparés et détectés à 320 nm. Les trois chromatogrammes, présentés ci-dessous, montrent respectivement les échantillons Cabernet Sauvignon Tanail (20.09.02), Cabernet Sauvignon Tanail (26.09.02) et Syrah Tal Dnoub (16.08.02).



Chromatogramme A : Cabernet Sauvignon Tanail – 20.09.02.



Chromatogramme B : Cabernet Sauvignon Tanail – 26.09.02.



Chromatogramme C : Syrah-Tal Dnoub 16.08.02.

**Figure 1. Chromatogrammes A, B et C représentant les composés phénoliques de 3 échantillons analysés par CLHP et détectés à 320nm. 1 : acide hydroxybenzoïque, 2 : épigallocatechine, 3 : acide cafféique, 4 : acide chlorogénique, 5 : épicatechine, 6 : acide ferrulique, 7 : gallate de catéchine, 8 : resveratrol, 9 : rutine, 10 : myricétol, 11 : quercétol.**

Ces trois chromatogrammes montrent la présence des composés phénoliques suivants : acide hydroxybenzoïque , épigallocatechine , acide cafféique, acide chlorogénique , épicatechine, acide ferrulique, gallate de catéchine , resveratrol, rutine , myricétol et quercétol.

Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent d'une variété à une autre et ce même pour deux échantillons d'une même variété de raisin, mais à différentes dates d'échantillonnages.

Les différences sont plus nettes entre deux chromatogrammes de deux échantillons différents (Chromatogrammes A et C, ou B et C) que ceux d'une même variété de raisin (Chromatogrammes A et B). Ceci démontre clairement que la quantité des composés phénoliques dépend de l'état de maturation des cépages et des terroirs cultivés (Le Moigne *et al.*, 2008 ; Pérez-Magariño & Gonzalez-San, 2006).

#### Etude qualitative des propriétés antiradicalaires par Chromatographie sur couche mince de silice – Dot Blot

Afin d'évaluer qualitativement l'activité antiradicalaire des composés phénoliques des quinze échantillons sélectionnés, on a étudié leurs propriétés antiradicalaires par la méthode qualitative au DPPH utilisant la chromatographie sur couche mince de silice. Cette méthode est généralement basée sur l'inhibition de l'accumulation des produits oxydés. Dans ce cas la génération des radicaux libres est inhibée par l'ajout de molécules antiradicalaires (Chang *et al.*, 2002). L'apparition des taches blanches met en évidence le pouvoir antiradicalaire des composés phénoliques, le DPPH ayant pour couleur initiale le bleu.

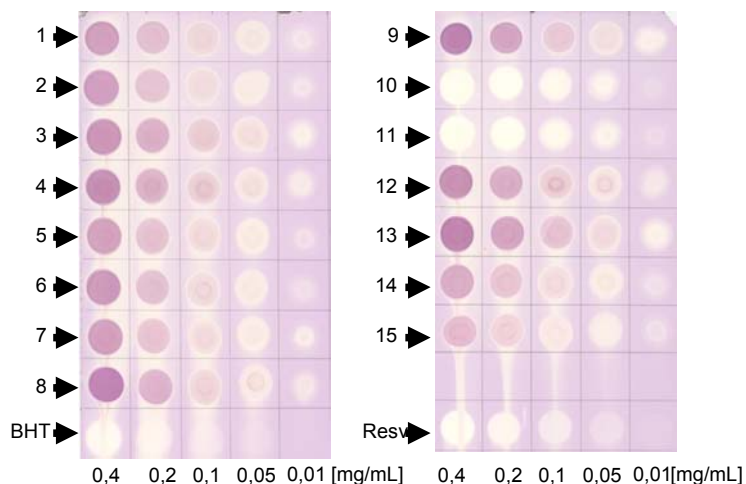


Figure 2. Dot Blot sur couche mince de silice représentant la chélation de DPPH par les composés phénoliques des 15 échantillons (Tableau 1).



La chromatographie sur couche mince de silice montre qu'il faut se référer en premier lieu aux résultats obtenus pour des faibles concentrations en composés phénoliques (0,05 et 0,01 mg/mL) afin de pouvoir valoriser leurs propriétés antiradicalaires, puisque ces résultats sont beaucoup plus expressifs (Figure 2). En effet, la coloration violette des extraits due à la présence des pigments anthocyaniques interfère avec la coloration bleue du DPPH d'une part et l'apparition des taches blanches d'autre part. En regardant les résultats à 0,01 mg/mL, on remarque que les échantillons 3, 9 et 13 sont les plus antiradicalaires alors que les échantillons 10 et 11 le sont beaucoup moins. Les échantillons 3, 9 et 13 sont avérés comme étant les plus concentrés en composés phénoliques totaux d'après le test de Folin-Ciocalteu (Tableau 1), alors que les échantillons 10 et 11 sont les moins concentrés. Cette observation est en parfait accord avec l'étude faite par Radovanović *et al.*, (2009) qui a démontré que les échantillons les plus riches en composés phénoliques totaux sont ceux présentant les meilleurs pouvoirs antiradicalaires et ce suite à une plus grande variété et une meilleure richesse en composés obtenus au sein des extraits.

#### Etude quantitative des propriétés antiradicalaires par la méthode au DPPH

Dans le but d'étudier quantitativement l'activité antiradicalaire des composés phénoliques des quinze échantillons sélectionnés, nous avons utilisé la méthode quantitative au DPPH. Cette méthode consiste à ajouter une concentration connue de composés phénoliques au DPPH qui à l'origine présente une coloration bleue. Une diminution de l'intensité de la couleur du DPPH, mesurée à 517 nm, reflète la présence de substances antiradicalaires dans le milieu. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH est calculé d'après la formule suivante : % d'inhibition = [(absorbance du control (BHT ou Resveratrol) – absorbance de l'échantillon) / absorbance du control] x 100. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH en présence des échantillons de raisin est représenté dans l'histogramme de la Figure 3.

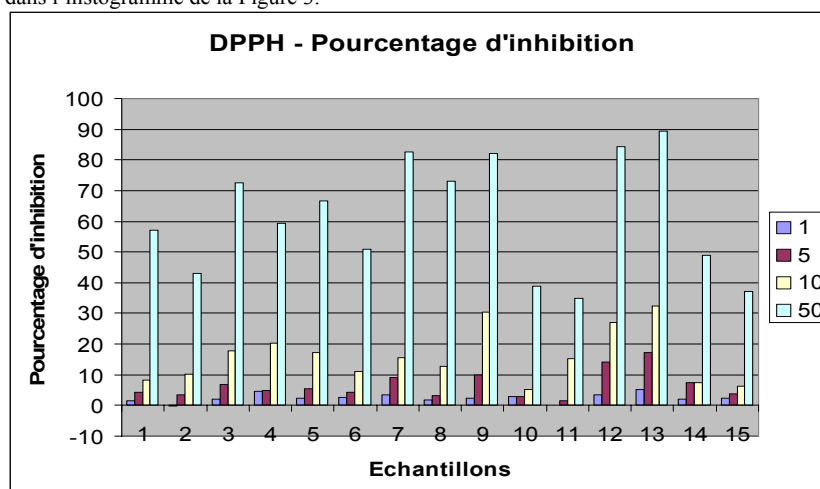


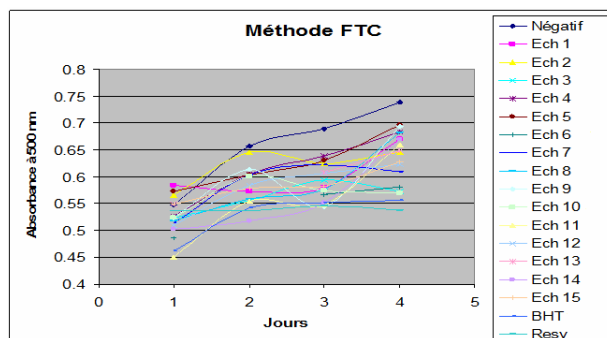
Figure 3. Histogramme représentant le pourcentage d'inhibition observé en fonction des échantillons étudiés aux concentrations 1 - 5 - 10 - ou 50 [mg/mL]. Les valeurs données sont la moyenne de trois répétitions.

On remarque que les échantillons 3, 7, 8, 9, 12 et 13 sont considérablement antiradicalaires, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70%. Alors que les échantillons 10 et 11 obtenus à partir des variétés blanches sont les moins antiradicalaires avec un pourcentage d'inhibition de moins de 40%. Les résultats des tests quantitatifs et qualitatifs pris ensemble démontrent donc que les échantillons 3, 9 et 13 sont les plus antiradicalaires. Ces échantillons sont extraits à partir de deux cépages rouges Cabernet Sauvignon et Syrah.

#### Etude des propriétés antioxydantes par la méthode du thiocyanate de fer (FTC)

La méthode du thiocyanate de fer (FTC) est employée (Markowicz *et al.*, 2006) pour étudier les propriétés antioxydantes des échantillons de raisin. Il s'agit de vérifier si les composés phénoliques empêchent la peroxydation des lipides provoquée par une incubation de ces derniers à 40°C en présence de composés phénoliques. Du thiocyanate d'ammonium ainsi que du chlorure ferreux sont ajoutés aux mélanges lipides-composés phénoliques. Les peroxydes entrent en réaction avec les ions ferreux  $Fe^{2+}$  et les transforment en ions ferriques  $Fe^{3+}$  qui réagissent avec le thiocyanate d'ammonium pour former le thiocyanate de fer qui a une coloration rouge dosable à 500 nm. La concentration de peroxydes dans le milieu réactionnel est proportionnelle à celle des ions  $Fe^{3+}$  et par conséquent la coloration sera encore plus rouge et l'absorbance encore plus élevée. Le témoin négatif réalisé en absence de composés phénoliques est supposé présenter l'augmentation de l'absorbance à 500 nm la plus significative.

Les résultats les plus significatifs sont révélés à une concentration de 0,1 mg/mL de composés phénoliques. Les résultats sont représentés dans le graphe de la Figure 4 :



**Figure 4. Graphe représentant les absorbances à 500 nm en fonction du temps d'incubation des différents échantillons utilisés à 0.1mg/mL en présence d'une émulsion d'acide linoléique. Les valeurs données constituent la moyenne de trois répétitions.**

La Figure 4 montre que les échantillons les plus antioxydants sont les échantillons 3, 6 et 10. Ceci reflète une concentration basse de peroxydes avec une faible transformation d'ions ferreux en ferriques. Il y a donc moins de formation de thiocyanate de fer et la coloration rouge sera moins intense contrairement aux échantillons 5 et 4 qui sont donc les moins antioxydants. L'information importante qui découle de cette partie est le fait de trouver un échantillon pris d'un cépage blanc, échantillon 10 (Sauvignon) parmi les plus

antioxydants. Cette observation valide à nouveau l'hypothèse qui stipule que le contenu et la richesse des cépages de raisins en composés phénoliques dépend non seulement du terroir, du climat ou des conditions viticoles mais aussi de la nature du cépage rouge ou blanc. En effet il est difficile d'établir une corrélation directe entre la composition en molécules phénoliques et l'activité observée. Il est clair que dans certains extraits l'activité obtenue est le fruit d'une synergie entre plusieurs variétés de composés phénoliques présents dans le même extrait.

#### Etude des propriétés bioactives par la méthode de l'altération de l'ADN

Il s'agit dans cette manipulation de mélanger de l'ADN avec des agents altérants. Le peroxyde d'hydrogène est l'agent altérant le plus souvent utilisé. Il libère des radicaux libres dans le milieu qui attaquent le squelette de l'ADN et le dégrade. Les extraits de composés phénoliques ont été ajoutés à l'ADN mélangé au peroxyde d'hydrogène pour voir à quel point sont-ils capables de protéger les acides nucléiques en solution (Kitts *et al.*, 1999). Les échantillons qui ont démontré les propriétés les plus antiradicalaires ont été utilisés dans cette étude (Tableau 3).

TABLEAU 3

#### Echantillons de Raisins Sélectionnés pour l'Etude de l'Altération de l'ADN par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Echantillon	Cépage	Parcelle	Date de l'échantillonnage	Concentrations [mg/L]
3	Merlot	Hsein Zoghbi	11.09.02	1034
7	Cabernet Sauvignon	Elias Estephan	16.09.02	950
9	Cabernet Sauvignon	Joseph Khoury	13.09.02	1079
12	Syrah	Youssef Hanna	20.09.02	844
13	Syrah	Youssef Hanna	09.09.02	924

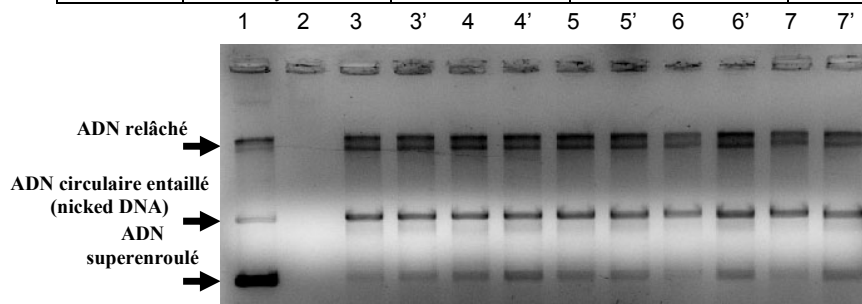


Figure 5. Profil de migration sur gel d'agarose des échantillons utilisés dans l'étude après incubation en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ligne 1: ADN (2 µg); Ligne 2: ADN (2 µg) + EDTA (30 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 g/L) + Fe<sup>2+</sup> (16 mM); Lignes 3,4,5,6 et 7: mêmes composés que ligne 2, + 2µL à 100mg/L de polyphénols des échantillons Merlot, Hassan Zoghbi 11/09/02 – Cabernet Sauvignon, Elias Estephan, 16/09/02 – Cabernet Sauvignon, Joseph Khoury, 13/09/02 – Syrah, Youssef Hanna, 20/09/02 – Syrah, Youssef Hanna, 09/09/02, respectivement. Colonnes 3',4',5',6', et 7': mêmes composés que ligne 2, + 2µL à 100mg/L de polyphénols des échantillons Merlot, Hassan Zoghbi 11/09/02 – Cabernet Sauvignon, Elias Estephan, 16/09/02 – Cabernet Sauvignon, Joseph Khoury, 13/09/02 – Syrah, Youssef Hanna, 20/09/02 – Syrah Youssef Hanna, 09/09/02, respectivement.

L'ADN plasmidique intact est supposé contenir une quantité d'ADN superenroulé plus grande que la quantité d'ADN relâché ou même circulaire entaillé, ce qui est observé dans la ligne 1 du gel où le puits a été chargé uniquement d'ADN dilué dans un tampon adéquat (*cf.* Matériels et méthodes). L'ajout de peroxyde d'hydrogène à l'ADN est supposé provoquer la disparition de ce dernier suite à sa dégradation (ligne 2). Il a été démontré que l'ADN le plus vulnérable à l'action du peroxyde d'hydrogène est l'ADN superenroulé ; celui circulaire entaillé, étant clivé d'un seul brin, est donc plus résistant aux agents altérants comme le peroxyde d'hydrogène (Kitts *et al.*, 1999).

On remarque en regardant la Figure 5, qu'à la ligne 2 et ce en présence de peroxyde d'hydrogène, l'ADN est complètement dégradé et aucune bande n'est visible. Alors que dans les lignes où on a ajouté des composés phénoliques, on observe les trois formes de l'ADN (linéaire, circulaire entaillé et superenroulé). L'intensité de la bande de l'ADN superenroulé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des extraits n'est pas aussi intense que dans la ligne où l'ADN est seul (ligne 1). Dans les colonnes où les composés phénoliques sont plus concentrés (lignes 3',4',5',6' et 7'), on observe la bande de l'ADN superenroulé plus intense que pour une concentration plus faible et ceci pour un même échantillon (lignes 3, 4, 5, 6, et 7). Donc plus la concentration en composés phénoliques est grande plus l'ADN est protégé. On peut ainsi affirmer que les échantillons Cabernet Sauvignon, Elias Estephan 16/09/02 (ligne 4') et Syrah, Youssef Hanna 09/09/02 (ligne 6') et 20/09/02 (ligne 7') présentent un effet plus antiradicalaire que les autres, l'intensité de la bande superenroulée à 100 mg/mL étant plus grande en présence de ces échantillons.

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, cette étude a pu démontrer l'importance des composés phénoliques extraits de raisins cultivés au Liban en les identifiant, en les analysant quantitativement et en examinant leurs propriétés bioactives. La composition des composés phénoliques et leurs teneurs ont été mises en évidence par CLHP et par la méthode de Folin Ciocalteu. On a pu mettre en évidence aussi les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des composés phénoliques de plusieurs variétés de raisin dans différents domaines de plantations de vigne Château KSARA. A une faible concentration de l'ordre de 50 mg/ml, les composés phénoliques ont pu inhiber l'activité du radical libre DPPH et à 0.1 mg/ml ils ont empêché la formation de peroxydes provoquée par l'incubation d'acides gras à température élevée. Il est aussi important de signaler que la majorité des échantillons étudiés présentent à forte concentration des propriétés antioxydantes et antiradicalaires très significatives y compris certains obtenus à partir de cépages blancs. A 100 mg/ml, nos composés phénoliques ont pu protéger significativement la dégradation de l'ADN contre des agents altérants montrant ainsi l'importance de l'utilisation de ces composés à l'échelle biologique *in vivo* comme agents protecteurs de l'ADN. Il est à noter que la teneur globale en composés phénoliques, exprimée en équivalent acide gallique, varie entre 50 et 350 mg/l dans les vins blancs et entre 800 mg/l et 4g/l dans les rouges (Singleton & Noble, 1976).

Plusieurs études ont démontré l'importance des composés phénoliques de raisin comme une source d'antioxydation et de chélation de radicaux libres ; ces derniers étant à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires et du développement de plusieurs cancers (Leifert & Abeywardena, 2008 ; Tagliazucchi *et al.*, 2010). Donc l'étude rigoureuse des composés phénoliques, de leur présence, de leur quantité ainsi que de leurs propriétés antioxydantes aiderait les scientifiques à mieux comprendre les relations qui existent entre la

composition phénolique et la qualité de certains produits consommés comme le raisin et le vin. En effet, le vin est considéré comme un enjeu socio-économique très important. Ainsi, les résultats de cette étude pourront aider à la mise en place d'une procédure d'analyse et de contrôle du raisin et du vin produits au Liban. Le consommateur pourra donc connaître la composition en composés phénoliques exacte du vin qu'il achète ainsi que tous les avantages à l'échelle de la santé que pourrait lui présenter le vin qu'il aurait décidé de consommer.

Ce travail ayant été effectué, il serait intéressant comme projet à venir de comparer les résultats des propriétés antioxydantes et antiradicalaires aux contenus des échantillons en composés phénoliques afin de déterminer ceux présentant les propriétés les plus bioactives. L'étude de l'effet des composés extraits sur les systèmes supra moléculaires cellulaires, impliquant les composés phénoliques en interaction avec d'autres molécules (protéines, polysaccharides, ions métalliques, *etc.*), serait aussi abordée. Il serait également fort intéressant d'incuber ces composés en présence de certaines lignées cellulaires *ad hoc* afin d'étudier leur comportement et leur viabilité en présence des extraits et d'analyser par transcriptomique les gènes qui seraient surexprimés ou sous exprimés en présence de ces molécules. Cette méthodologie permettra de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules à l'échelle cellulaire et donc de mieux valoriser leurs propriétés bioactives.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Conseil National de la Recherche Scientifique du Liban (CNRSL) et par le Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph (Projets FS2 et FS18)

#### RÉFÉRENCES

- Aruoma, O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxic.*, 32: 671-683.
- Bautista, O., Fernandez, F., Lopez, R., Gomez, P. 2007. The effects of oenological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 546-552.
- Brat, P., Georges, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., Amiot, M.J. 2007. Daily polyphenol intake in France from fruits and vegetables. *Journal of Nutrition*, 136: 2368-2373.
- Chang, W.C., Sei, C. K., Soon, S.H., Bong, K.C., Hye, J.A., Min, Y.L., Sang, H.P., Soo, K.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163: 1161-1168.
- Flanzy, C. 1998. *Enologie : fondements scientifiques et technologiques*. Ed. TEC & DOC, 1311 pages.
- Guyot, C., Duprazi, P. 2004. Déguster les baies pour suivre la maturité du raisin. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 36: 231-234.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K. 2009. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT. Food Science and Technology*, 42: 1269-1274.
- Ho, P., Hogg, T.A., Silva, M.C.M. 1999. Application of a liquid chromatography for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry*, 64 : 115-122.

- Huang, D.J., Chen, H.J., Lin, C.D, Lin, Y.H. 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46: 99-106.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J.E. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 42 :64-69.
- Kitts, D.D., Yvan, Y.V., Wijewickreme, A.N., Thompson, L.U. 1999. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 202: 91-100.
- Leifert, W.R, Abeywardena, M.Y. 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research*, 28: 729-737.
- Le Moigne, M., Symoneaux, R., Jourjon, F. 2008. How to follow grape maturity for wine professionals with a seasonal judge training? *Food Quality and Preference*, 19: 672-681.
- Markowicz, B.D., Ishimoto, E., Marques, M., Ferri, A., Torres, E. 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 538-543.
- Min, K., Ebeler, S.E. 2008. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 96-10.
- Pérez-Magariño, S., González-San, J.L. 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96: 197-208.
- Pincemaila, J., Degruneb, F., Voussurec, S., Malherbec, C., Paquotd, N., Defraigne, J.O. 2007. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21: 66-75.
- Radovanović, A., Radovanović, B., Jovančićević, B. 2009. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*, 117: 326-331.
- Ramassamy, C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545: 51-64.
- Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Gabello, F., Martin-Ortega, M., Ryan, J.M. 2001. Value of high performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915: 53-60.
- Ribéreau-Gayon, P. 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Ann. Physiol. Vég.*, 6: 211-242.
- Scalbert, A., Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073-2085.
- Segade, S., Rolle, L., Gerbi, V., Orriols, I. 2008. Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 599-607.
- Singleton, V.L., Noble, A.C. 1976. Wine flavor and phenolic substances. *ACS Symp. Series*, 26: 47-70.
- Stoclet, J.-C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Min-Ho, O., El Jasser, B., Marta, C., Valerie, B., Schini, K. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500: 299-313.

- Subirade, I., Fernandez, Y., Periquet, A., Mitjavilla, S. 1995. Catechin protection of 3T3 Swiss fibroblasts in culture under oxidative stress. *Biol. Trace Elem. Res.*, 47: 313-319.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., Conte, A. 2010. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120: 599–606.
- Vinson, J.A., Hontz, B.A. 1995. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 401-403.
- Vivas, N., St-Cricq de Gaulejac, N., Demptos, T., Glories, Y., 1998. Maturation phénolique des raisins rouges. Relation avec la qualité des vins. Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 115: 306-318.
- Waterhouse, A.L. 2001. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, II.1.1-11.1.8.
- Weiguang, Y., Joan, F., Casimir, C.A. 2005. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8804–8812.
- Wu, J., Tung, Y., Wang, S., Shyur, L., Kuo, Y., Chang, H. 2005. Phenolic antioxidants from the heartwood of acacia confuse. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5917-5921.