

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

CHAOUI BOUDGHANE Amina et CHOUITI Nouha Firdaws

En vue de l'obtention du **Diplôme de MASTER** En Sciences Alimentaires
Option : Nutrition et Pathologie

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante in-vitro d'huile des pépins de raisin

Soutenu le 28/06/2021, devant le jury composé de:

Présidente	Medjoub Amel	MCA	Université d'Oran
Promotrice	Boudghene-Guerriche Amina	MCA	Université Ain Temouchent
Examinatrice	Saisdi-Merzouk Amel	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2020/2021

Dédicaces

A ma très chère mère Houria

Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Votre prière et bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Allah, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A la mémoire de mon cher père Omar

Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Allah, tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A mes chères sœurs et mes chers frères Mahmoud, Kawther, Zeyneb et Taha pour leur tendresse, leur complicité et leur présence malgré la distance qui nous sépare.

A mon beau-frère Mohamed et ma belle-sœur Wahida.

A tous mes neveux et nièces.

A mon binôme et ma chère amie Amina, Merci énormément pour ton soutien plus que précieux et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous, Merci pour ton grand cœur.

Nooba

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon cher père Kheir Eddine. Que Allah me rejoindre avec lui au paradis «amen».

A ma chère maman l'hem la femme combattante la plus forte qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse.

A mes chères sœur Zahira et Meriem pour leurs aides et leur soutien dans mes moments chargés.

A l'homme de ma vie Mounaim, ma source de bonheur et d'espoir pour sa présence et sa compréhensibilité. «Que Allah nous rassemble le plus tôt possible»

A mes très chères grands-mères Nouria et Fatima, mon bon exemple dans la vie pour leurs prières sincères et que Allah les protège pour nous.

A mes agréables cousins Assia, Merwane et sa femme Téma, Vous êtes mes grands frères, ma source de joie et mon exemple de la réussite.

A tous mes oncles et leurs épouses, mes tantes et leurs époux ainsi que leurs enfants pour leur amour et leur confiance.

A ma chère Nouha mon binôme la fille adorable qui a été près de moi tout le long de notre parcours universitaire, on a vécu des moments inoubliables pleins de joie, d'amour et de respect.

Merci pour ta présence ton soutien, tu es vraiment un trésor.

A l'amie de ma vie, mon grand amour Ines qui a été avec moi dans les bons et les mauvais moments de la vie depuis notre enfance.

A mes chères élèves du lycée «Ahmed Bey» à Oudjilida je vous oublierai jamais, j'ai passé les plus agréables moments de ma vie avec vous et j'espère que vous m'oubliez pas.

Amina

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercions « Allah » tout puissant de nous avoir donnée la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

*Nous tenons à remercier sincèrement notre promotrice, Dr **BOUDGHENE-QUERRICHE Amina**, Maître de conférences au département de Biologie de l'université d'Ain Témouchent, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils .Merci Vous êtes une excellente promotrice que beaucoup d'étudiants aimeraient avoir. Nous ne vous oublierons jamais.*

*.Nos sincère remerciement vont au Dr, **Medjoab Amel** maître de conférences au département de Biologie à l'université d'Oran de nous avoir honoré de présider ce jury et d'évaluer ce mémoire.*

*Nous adressons également notre profonde reconnaissance au Dr, **Saisdi-Merzouk Amel** maître assistante au département de Biologie à l'université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail.*

ملخص

الأشكال المختلفة لاستهلاك العنب، والتي ينتج عنها نفايات النبيذ؛ مارك العنب التي يتم إطلاقها في البيئة ويسبب العديد من المشاكل البيئية، تمثل بذور العنب جزءًا كبيرًا من المارك التي تعد مصدرًا ممتازًا لمركبات البوليفينول ، ويؤدي تثمين هذه المنتجات الثانوية إلى الحصول على زيت بذور العنب (HPR) الغني بالأحماض الدهنية والمركبات الفينولية والفيتامينات ويعرض العديد من الأنشطة البيولوجية. تهدف دراستنا إلى تقييم قدرة مضادات الأكسدة في المختبر لزيت بذور العنب واختبارها على الخلايا الليمفاوية البشرية التي سبق تأكسدها بواسطة (H_2O_2) وذلك بقياس علامة العدوان الخلوي (LDH) و بقياس علامات الاكسدة (MDA) و (PCAR) وكذلك بقياس مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة (GSH) و (CAT)، نتائجا اظهرت ان زيت بذور العنب تسمح بنقصان كمية علامات الاكسدة وزيادة مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة عند تراكيز معينة.

الكلمات المفتاحية: زيت بذور العنب، نفايات النبيذ، نشاط مضادات الاكسدة، الخلايا اللمفاوية

Résumé

Les différentes formes de consommation du raisin dont la vinification engendrent des déchets vinicoles ; le marc de raisin qui est rejeté dans l'environnement et provoque plusieurs problèmes écologiques les pépins de raisin représentent une portion importante du marc qui sont une excellente source de composés polyphénoliques, la valorisation de ces sous-produits conduit à l'obtention de l'huile des pépins de raisin (HPR) qui est riche en acides gras, composés phénoliques et en vitamines et présente plusieurs activités biologiques. Notre étude a pour but d'évaluer la capacité antioxydante in vitro de l'HPR testé sur les lymphocytes humains préalablement oxydés par le H₂O₂ en mesurant le taux des marqueurs d'agression cellulaires (LDH), les marqueurs de l'oxydation (MDA, PCAR) ainsi que les marqueurs antioxydants et le taux des enzymes antioxydants endogènes (GSH, CAT). Nos résultats montrent que l'HPR augmente le taux du GSH et CAT et diminue le taux du LDH, MDA et PCAR à des concentrations bien déterminées.

Mots clés: Déchets vinicoles, HPR, activité antioxydante, lymphocytes.

Abstract

The different forms of grape consumption, the vinification of which generates wine waste; the grape marc which is released into the environment and causes several ecological problems the grape seeds represent a significant portion of the marc which are an excellent source of polyphenolic compounds, the valorization of these by-products leads to obtaining the Grapeseed Oil (HPR) which is rich in fatty acids, phenolic compounds and vitamins and exhibits several biological activities. Our study aims to evaluate the antioxidant capacity in vitro of the HPR tested on human lymphocytes previously oxidized by H₂O₂ by measuring the level of cellular aggression markers (LDH), oxidation markers (MDA, PCAR) as well as antioxidant markers and the level of endogenous antioxidant enzymes (GSH, CAT). Our results show that HPR increases the level of GSH and CAT and decreases the level of LDH, MDA and PCAR at well-defined concentrations.

Keywords: Wine waste, HPR, antioxidant activity, lymphocytes

Liste des abréviations

AG: Acide Gras	LDL: Lipoprotéine de Basse Densité
AGI: Acide Gras Insaturé	NLT: Nombre Total des Lymphocytes
AGPI: Acide Gras Polyinsaturé	MDA: Malondialdéhyde
AGS: Acide Gras Saturé	O₂-: Anion Superoxyde
AL: Acide Linoléique	PB: Prolifération Basale
CAT: Catalase	PCAR: Protéine Carbonylée
CCL₄: Tétrachlorure de carbone	ROOH: Peroxyde Organique
CO₂: Dioxyde de Carbone	SC-CO₂: Dioxyde de Carbone Supercritique
Con A: Concanaline A	
DT2: Diabète de Type 2	
DOX: Doxorubicine	
EAM: Extraction Assisté par Micro-ondes	
EAU: Extraction Assisté par Ultrasons	
ELP: Extraction Liquide sous Pression	
EPR: Extrait de Pépin de Raisin	
ERO: Espèce Réactive d'Oxygène	
GSH: Glutathion Réduit	
GSH-Px: Glutathion Peroxydase	
GST: Glutathion –S-Transférase	
H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène	
HO-: Radical Hydroxyle	
HPR: Huile de Pépin de Raisin	
I/R: Ischémie/Réperfusion	
LDH: Lactate Déshydrogénase	

Liste des figures

Figure 01: Un cépage renferment des grappes de raisin.	06
Figure 02: Compartiments de la baie de raisin.	06
Figure 03: Représentation du pépin de raisin et de ses structures cellulaires.	08
Figure 04: Structures chimiques des principaux composés de l'HPR	13
Figure 05: Effet de l'HPR sur le NLT	28
Figure 06: Effet de l'HPR sur le taux de la LDH dans les lymphocytes	28
Figure 07: Effet de l'HPR sur le taux du GSH lymphocytaire:	30
Figure 08: Effet de l'HPR sur l'activité de la CAT dans les lymphocytes.	30
Figure 09: Effet de l'HPR sur les teneurs des lymphocytes en MDA	32
Figure 10: Effet de l'HPR sur les teneurs lymphocytes en PCAR	32

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition du tocopherol et du tocotrienol (mg/kg d'huile) dans les huiles de pépins de raisin trouve dans la littérature. **14**

Tableau 2: La composition en phytosterols (mg/kg d'huile) dans huile de pépin de raisin. **15**

Tables des matières

Introduction	01
Etat actuel du sujet	
1. De la vigne et du raisin en général.	04
2. Pépins de raisin.	07
3. L'huile des pépins de raisin.	09
Matériels et méthodes	
1. Extraction du matériel végétal (pépins de raisin).	21
2. Epuisement des pépins de raisin avec l'éthanol.	21
3. Isolement des lymphocytes humains.	22
4. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MMT.	22
5. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau lymphocytaires.	23
5.1 Mesure de la Lactate déshydrogénase libérée dans les lymphocytes.	23
5.2 Détermination des taux en Glutathion réduit des lymphocytes.	24
5.3 Détermination de l'activité de la Catalase dans les lymphocytes.	24
5.4 Teneurs en Malondialdéhyde des lymphocytes.	24
5.5 Teneurs en Protéine carbonylée des lymphocytes.	24
6. Analyse statistiques.	25
Résultats et interprétations	
1. Effet de l'HPR sur le NLT	27
2. Effet de l'HPR sur le taux de la LDH dans les lymphocytes	27
3. Effet de l'HPR sur le statut anti oxydant.	29
3.1 Effet de l'HPR sur le taux du GSH lymphocytaire:	29
3.2 Effet de l'HPR sur l'activité de la CAT dans les lymphocytes.	29
4. Effet de l'HPR sur le statut oxydant.	31
4.1 Effet de l'HPR sur les teneurs des lymphocytes en MDA	31

4.2 Effet de l'HPR sur les teneurs lymphocytes en PCAR	31
Discussion	34
Conclusion	42
Références bibliographiques	45

Introduction

De nombreuses activités industrielles génèrent des effluents et des déchets colossaux qui doivent être traités. Certaines industries produisent des résidus avec une forte teneur en matière organique, notamment les industries agricoles et alimentaires.

L'utilisation des déchets agro-industriels est un excellent moyen de valoriser les industries de production et de transformation des cultures, avec l'avantage supplémentaire de réduire les problèmes et leur d'élimination (**Lutterod et al., 2011**).

Parmi les déchets agricoles les plus considérables on retrouve les déchets vinicoles dont le marc de raisin qui est un sous-produit abondant de l'industrie vinicole, il se compose du reste de la peau, des pépins et des tiges et représente environ 25 % du poids total du raisin utilisé dans le processus de vinification. Dans des pays comme l'Italie, la France et l'Espagne, où la production de vin est plus importante, le marc de raisin peut atteindre près de 1200 tonnes par an et pour parvenir à un processus de vinification durable, une politique de réduction et de valorisation des déchets est nécessaire (**Abarghuei et al., 2010 ; Christ et Burrit, 2013 ; Cuccia, 2015**)

En effet, le raisin est la culture mondiale majeure qui assit sur une superficie de 7.4 millions d'hectares et avec une production de 78 millions de tonnes en 2019 (**OIV, 2019**). Et selon des statistiques MADRP 2018 la viticulture en Algérie est reposée sur une superficie de 69.642 d'hectares et avec une production totale de 5665787 quintaux (**MADRP, 2018**).

L'utilisation du marc de raisin comme source d'ingrédients fonctionnels est un domaine prometteur en raison de sa richesse en composés bioactifs.

Les pépins de raisin représentent entre 2 et 5% du poids du raisin et constituent environ 38 à 52 % de marc (**Brenes et al., 2016**). Ils sont principalement appréciés pour les propriétés nutritionnelles de l'huile riche en acides gras insaturés et les composés phénoliques (**Bail et al., 2008; Hanganu et al., 2012**).

L'huile des pépins de raisin (HPR) avec sa richesse en composés bioactives bénéfiques pour la santé est devenue une forme importante de la valorisation des déchets vinicoles.

Les composés chimiques bioactifs lipophiles et hydrophiles présents dans l'HPR font de ce sous-produit du vin une source de nutraceutiques naturels alimentaire et non alimentaire, pour cela, des méthodes de récupération de l'huile des pépins de raisin ont évolué pour améliorer à la fois la quantité et qualité du rendement (**Martin et al., 2020**).

Les effets curatifs de l'HPR sont présentés dans la littérature depuis le 14ème siècle, en Espagne, quand un médecin arabe utilisa l'HPR pour traiter des problèmes de la peau dont souffre Ferdinand IV (roi de Castille-et-Léon dans la péninsule ibérique). Le roi a décidé de garder sa composition et la nomma «huile royale» ou «huile du trône» (**Sotiropoulou et al., 2012**).

Parmi les propriétés les plus importantes de l'HPR, la propriété antiradicalaire ou antioxydante qui sert à piéger les espèces réactives d'oxygène (ERO) induits par différents oxydants et qui provoquent des dommages sur les molécules biologiques de la cellule.

Dans cette optique, ce travail a pour but d'évaluer l'activité antioxydante de l'HPR sur les lymphocytes humains afin de déterminer la concentration optimale d'HPR qui permet de réduire les marqueurs d'oxydation lymphocytaires et d'augmenter la capacité des lymphocytes à se défendre contre le stress oxydatif.

Etat actuel du sujet

1. Du raisin et de la vigne en général:

La vigne, dans le sens propre du mot ne peut être rangée parmi les arbres, il n'est cependant pas l'arboriculteur qui la néglige. Comme le disait déjà Columelle, elle mérite d'être placée au premier rang des arbres fruitiers, non seulement à cause de ses grappes délicieuses mais parce qu'elle peut plus facilement que beaucoup d'autres avec un peu de soins et de précautions croître et prospérer dans presque tous les pays et dans tous les terrains (**Schneyder, 1869**).

Le raisin est l'un des fruits les plus anciennement produits. La culture de la vigne est probablement apparue dans la Caucase. Peu après 1000 avant J-C les Phéniciens apportèrent la vigne en Grèce où elle proliféra. Elle se répand dans le bassin méditerranéen au début de l'ère chrétienne puis les Romains l'introduisent dans la plupart des pays d'Europe. Vers la fin du quinzième siècle, Christophe Colomb importa la vigne dans le nord d'Amérique, aussi à la fin du dix-huitième siècle l'Australie se révéla favorable au développement de cette dernière (**500 plantes comestibles, 2013**).

La viticulture en Algérie remonte à l'Antiquité et particulièrement sous la domination de la Phénicie puis de l'Empire romain. Après, la colonisation française, suite à la guerre d'Algérie en mille-huit-cent trente (**Isnard, 1953**).

Le raisin du genre *Vitis vinifera* L est la principale espèce de raisin cultivée. Cette espèce angiosperme de la famille des Vitacées (**Figure 01**) (**Le Bellec et Renard, 2010**). Si toutes les vignes appartiennent à une seule espèce *Vitis vinifera*, cette espèce comprend plus de 5000 cépages différents par leur aspect et la qualité de leurs fruits repartis sur l'Europe et une grande partie de l'Asie. En viticulture le terme cépage désigne une variété cultivée obtenue au cours des temps par la sélection d'individus au sein d'une population sauvage donc ne constituent pas une population homogène (**Hidalgo, 2012**).

C'est un arbrisseau sarmenteux, dressé ou grimpant comme une liane dès qu'elle rencontre un support (**Elisabeth et Jérôme, 2014**).

On distingue sur chaque vigne une partie enterrée formée par les racines plus ou moins grosses et plus ou moins vieilles dont les extrémités plus fines et plus jeunes constituent le chevelu et une partie aérienne ou couvert dans laquelle on distingue: le tronc, les bras et les sarments qui subsistent plusieurs années ainsi que les feuilles, les fleurs et les vrilles dont la durée de vie ne dépasse généralement pas un an, la zone qui relie ces deux parties s'appelle le collet et ces fonctions sont solidaire et conjointes (**Hidalgo, 2012**).

Les fleurs fécondées donnent naissance à des petits grains de raisin ou baies qui grossissent rapidement, c'est une baie classé dans le groupe des fruits charnus à pépins, la grappe est constitué de deux parties: la rafle qui est la charpente et le fruit dit grain ou baie de raisin (**Reynier, 2012**).

Chez des nombreux cépages, le grain de raisin a une forme sphérique mais il existe d'autre forme aplatie, elliptique, ovoïde, concernant la taille on peut classer les baies en trois grosseur: petite, moyenne et grosses (**Marielle et Jean-Claude, 2011**).

Le raisin se compose de 15 à 20% de pellicule, 75 à 85% de pulpe, et 3 à 6% de pépins (**Cabanis et al., 1998**).

La pellicule ou peau de grain de raisin est constitué de six à dix assises de cellules: la cuticule, l'épiderme, l'hypoderme; La pulpe est constitué de plusieurs assises de grandes cellules a parois minces le tous est irriguées par des faisceaux libéro-ligneux parmi lesquels on distingue un axe central: le pinceau qui alimente les pépins (**figure 02**) (**Reynier, 2012**).

Le renommé du raisin n'est plus à faire, le raisin de table se consomme frais mais peut également être séché. Le raisin de cuve sert à la préparation du vin, le jour de récolte doit être très bien cerné car contrairement à la plupart des fruits la maturation du raisin ne poursuit plus lorsqu' il a été détache de la souche (**Le Bellec et Renard, 2010**).



Figure 01: Un cépage renferme des grappes de raisin

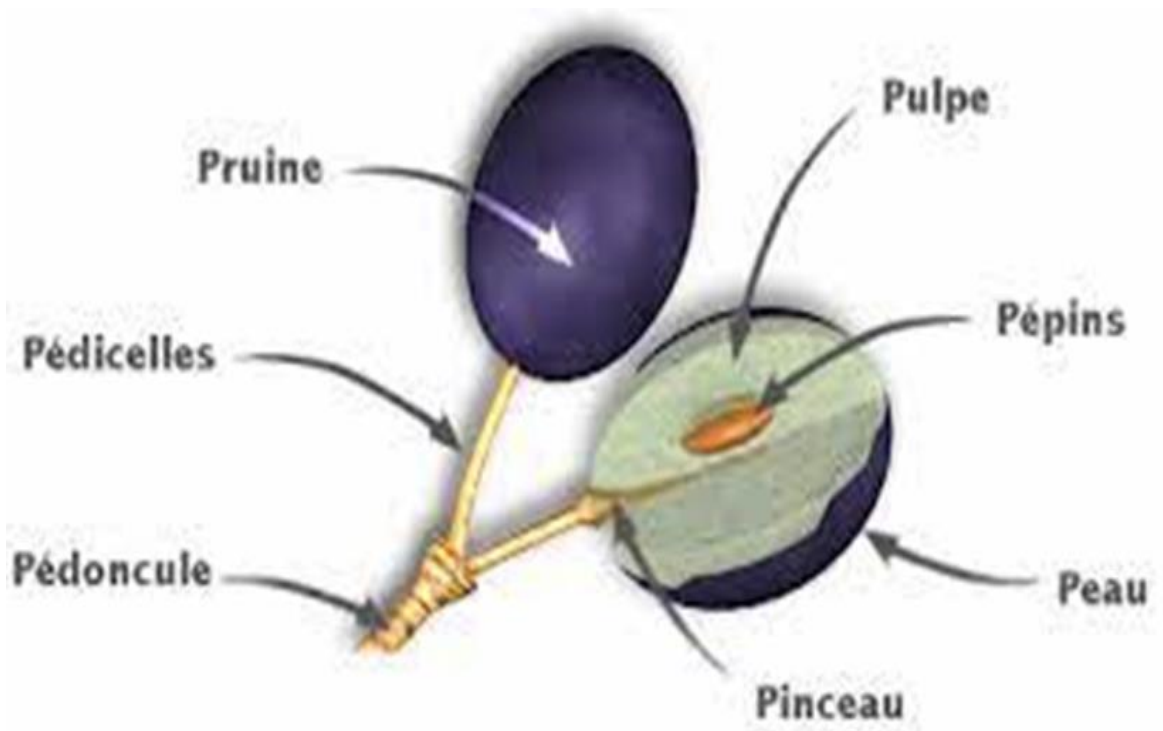


Figure 02: Compartiments de la baie de raisin

2. Pépins de raisin:

Les pépins, ou graines proviennent de la fécondation des ovules, il y a théoriquement quatre ovules mais on constate le plus souvent la présence d'un nombre plus réduit de pépins parce que la pollinisation et la fécondation ne se réalisent pas toujours dans les meilleures conditions. Les baies des cépages apyrènes (sultanine B) n'ont pas de pépins ou des pépins atrophiée, les pépins présentent un bec correspondant micropyle, une face dorsale renflée avec un sillon profond et élargi dans le centre, la chalaze une partie ventrale avec deux fossettes séparées par une arête parcourue par le raphé.

Une coupe dans le plan médian met en évidence, les téguments séminaux: formées de plusieurs assises de cellules qui ont un rôle protecteur, l'albumen de couleur blanc nacré, qui occupe le plus grand volume de la graine et contient des grains d'aleurones (substance protéique) et l'embryon qui est situé dans la région micropylaire (**figure 03**) (**Reynier, 2012**).

La couleur des pépins évolue du vert au marron au cours de leur développement (**Cadot et al., 2006**). Bhy »

Les pépins de raisin dont est issue l'huile éponyme, sont des coproduits de l'industrie vinicole (**Lutterodt et al., 2011; Shinagawa et al., 2015**).Après vinification du raisin, se trouvent, en fond de cuve sous forme de marcs. Ces derniers sont extraits puis livrés aux distilleries. Ils contiennent en moyenne de l'ordre de 15% de pépins, 30 % de pulpes et rafles, et 55 % d'eau. En effet, le pépin de raisin, et plus généralement le marc, était encore dans les années 1970 un coproduit de l'industrie vinicole auquel il fallait trouver un débouché, suite à l'interdiction de leur épandage en agriculture, mais aujourd'hui les pépins de raisin sont utilisés dans plusieurs domaines : la fabrication de peintures, la cosmétologie, la savonnerie. La quantité de pépins de raisin reçue à l'usine dépend de la quantité de raisin mis en vinification, et donc de la récolte de raisin. La quantité d'huile contenue dans les pépins de raisin est de l'ordre de 15 à 18 % Ainsi, il est nécessaire de triturer de l'ordre de 7 kg des pépins de raisin pour obtenir 1 litre d'huile des pépins de raisin (**Pierron, 2017**).

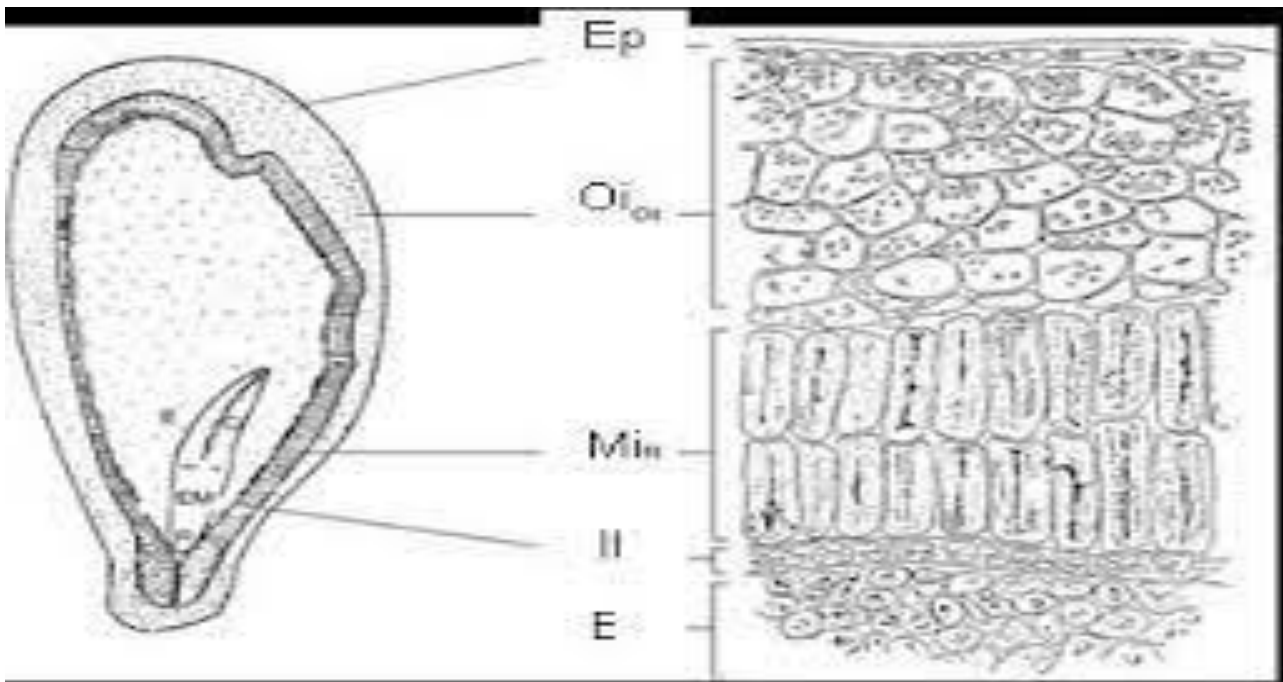


Figure 03 : Représentation du pépin de raisin et de ses structures cellulaires : C, cotylédons ; E, endosperme (albumen) ; EM, embryon ; Ep, épiderme ; II, tégument inférieur ; MI, tégument intermédiaire ; OI, tégument supérieur ; R, radicule

(Levadoux, 1951; Ravaz, 1915)

Ils contiennent 8 à 20% d'huile composée de deux principaux acides gras (AG); AG linoléique (C18: 2n – 6) à 58-78% et AG oléique (C18: 1n – 9) à 10–20% (Crews et al., 2006; Lutterodt et al., 2011). Les acides gras saturés (C16: 0, C18: 0, C20: 0) représentent 10% des acides gras totaux et conduisent à une stabilité inhabituelle de l'huile (point de fumée élevé) (190–230 °C) (Morin, 1996).

En plus de leur composition en AG; les pépins de raisins sont considérés comme une source pertinente de composés polyphénoliques, principalement les catéchines, épicatechines, l'acide gallique, et les procyanidines (Monagas et al., 2003). De plus, il a été prouvé que ces composés polyphénoliques ont divers effets biologiques tels que antioxydant ou antimicrobien (Baydar et al., 2006; Jayaprakasha et al., 2003). De ce fait, les propriétés physicochimiques importantes et le mélange en polyphénols contenus dans les pépins de raisin offrent des voies de valorisation pour ces sous-produits (Baydar et al., 2007).

3. L'Huile des pépins de raisin:

L'huile des pépins de raisin (l'HPR) est une forme de valorisation des pépins issus des déchets vinicoles, c'est une huile stable et inodore. Son intérêt en tant que produit alimentaire fonctionnel a augmenté en raison des niveaux élevés de ses constituants hydrophiles tels que les composés phénoliques, lipophiles comme la vitamine E, les acides gras insaturés et les phytostérols (**Karaman et al., 2015**).

L'HPR est extraite par différentes méthodes ayant une première étape commune qui est le broyage des pépins jusqu'à l'obtention d'une poudre.

L'extraction de l'HPR peut s'appuyer sur des techniques mécaniques de pressage ou par les solvants organiques (hexane) dans l'extracteur de Soxhlet. Cette dernière est la méthode la plus coûteuse car elle nécessite une étape finale de purification en raison de la toxicité de l'hexane et pour l'élimination des pigments et des cires, générant un produit sombre et visqueux.

Ces deux techniques permettent d'obtenir un rendement élevé en huile mais la température de travail élevée limite la préservation de la qualité et la quantité des composés obtenus (**Dimic et al., 2020; Shinagawa et al., 2015; Sotiropoulou et al., 2015**).

Cependant, l'extraction par pressage à froid est devenue une méthode alternative pour obtenir une huile de qualité, en résolvant le problème de température, bien que le rendement soit plus faible, sauf si le protocole comprend un prétraitement enzymatique qui modifie les parois cellulaires et améliore l'extraction de l'huile, qui devient une source beaucoup plus sûre de composés phytochimiques bénéfiques pour la santé et peut même entraîner des teneurs en acides gras et en tocophérol plus élevées dans la composition de l'huile finale (**Karaman et al., 2015; Tobar et al., 2005**).

Un autre solvant est utilisé dans l'extraction par essences (solvants organiques) qui est l'éthanol, est l'HPR obtenue ne subit pas une purification (élimination du solvant) en raison de la faible toxicité de l'éthanol pour les cellules (**Singleton et Rossi, 1965**).

Des techniques de pressage mécanique par expulseur ont également été testées pour obtenir de l'HPR. Les conditions de fonctionnement de l'expulseur, telles que la température et la vitesse, peuvent améliorer le temps et le rendement, alors que l'humidité de l'échantillon réduit la production (**Venkitasamy et al., 2014**).

L'extraction par fluide supercritique (SC-CO₂); utilise des fluides et du Dioxyde de carbone(CO₂), a été postulé comme étant un protocole approprié pour la récupération des antioxydants lipophiles à partir des déchets vinicoles (**Dimic et al., 2020**).

D'autres méthodes d'extraction d'huile qui sont aussi très efficaces, comprennent l'extraction liquide sous pression (ELP) (**Ballesteros-Vivas et al., 2019; Villanueva-Bermejo et al., 2019**), extraction assistée par micro-ondes (EAM) et extraction assistée par ultrasons (EAU) (**Böger et al., 2018; Da Porto et al., 2013**). L'EAM utilise les ondes électromagnétiques non ionisantes qui sont transformées en énergie thermique, alors que les EAU prennent avantage de la pression négative après le traitement par ultrasons.

Les deux techniques recherchent des dommages dans la cellule murs pour faciliter l'extraction (**Dimic et al., 2020**). Les rendements lipidiques de l'ELP, l'EAM et l'EAU, sont similaires à ceux extraits à l'hexane (**Castejón et al., 2018**). Certains résultats ont démontrés que le protocole EAM est convenant à l'extraction d'antioxydants phénoliques à partir de pépins de raisin (**Krishnaswamy et al., 2018**).

Aussi, l'extrait aqueux de l'HPR (à l'eau chaude de 80°C à 90°C pendant 5h dans l'appareil de Soxhlet) donne des rendements élevés d'huile de haute qualité en réduisant le temps et les frais de la production (**Jayawardena et Smith, 2010**).

Le rendement en HPR dépend de la technique d'extraction, du type de solvant et des conditions d'exploitation employées, de la variété des cultivars et des facteurs environnementaux pendant l'année de récolte (**Duba et Fiori, 2015**). En revanche peu d'informations ont été trouvées dans la littérature concernant les différences dans les compositions de l'HPR en fonction des méthodes d'extractions, donc des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la production des composés bioactifs en utilisant des protocoles respectueux de l'environnement (**Shinagawa et al., 2015**) et pour

déterminer si la méthode d'extraction d'huile peut affecter ses composants antioxydants (**Shinagawa et al., 2015; Ma et Zhang., 2017**).

La plupart des constituants de l'HPR sont des molécules lipophiles, qui comprennent également plusieurs composés biologiques importants (**figure 04**).

Trois groupes de molécules inclus dans les constituants lipophiles totaux des pépins de raisin qui sont: Les AG, les isomères de la vitamine E et le phytostérol (ils sont cités par ordre de concentration décroissante)

Les acides gras insaturés (AGI) représentent près de 90% de la composition totale des AG de l'HPR, dont 65 à 75% d'acide linoléique (C18: 2n-6) et 20–40% d'acide oléique (C18: 1n-9). En revanche, les acides gras saturés (AGS) sont présents dans des quantités d'environ 10% (**Fernandes et al., 2013; Garavaglia et al., 2016; Lachman et al., 2015; Navas, 2009**).

La composition lipidique de l'HPR affecte sa durée de conservation en raison de la sensibilité des AGI à l'oxydation (**Kochhar et Henry, 2009**). Alors que les composés phénoliques existants dans cette huile sont bénéfiques pour sa conservation, en augmentant la stabilité oxydative de l'huile (**Siger et al., 2008**).

La vitamine E est connue avec son activité antioxydante remarquable, ce qui le rend bénéfique pour la santé humaine (**Fernandes et al., 2013; Garavaglia et al., 2016; Shinagawa et al., 2015**). Jusqu'à 50 mg de vitamine E est présente pour 100 g d'HPR, mais ceci dépend des conditions de culture et du type de raisin analysé.

En effet, l'HPR, comme les autres huiles végétales contient des isomères de vitamine E (des tocophérols et des tocotriénols) à différentes concentrations, comme le montre le **tableau 1**, où en général la teneur en tocotriénols est plus élevée par rapport aux tocophérols. La présence des deux isomères est également affectée par le degré de maturation des pépins de raisin et des baies (**Górna's et al., 2019**).

Les phytostérols sont également des molécules lipophiles présentes dans l'HPR, à environ 2–11 mg / g d'huile. Comme déjà mentionné pour d'autres constituants ; la concentration de stérols dans l'huile de graines est affectée par les conditions de récolte et la

méthode d'extraction de l'huile. Le **tableau 2** montre le contenu du phytostérols dans l'HPR. La concentration la plus élevée trouvée était le β -sitostérol, jusqu'à 65%. L'importance biologique du phytostérol est due à son activité antioxydante ainsi qu'à son rôle dans le métabolisme du cholestérol. En particulier, le β -sitostérol ainsi que des polyphénols de l'industrie vinicole ont montré une activité cardioprotectrice in-vitro en empêchant la libération des molécules pro-inflammatoires et pro-athérogènes (**Shinagawa et al., 2015; Garavaglia et al., 2016; Górná s et al., 2019**).

Les constituants hydrophiles de l'HPR se sont les composés phénoliques, notamment des flavonoïdes, des caroténoïdes, des acides phénoliques, des tanins et des stilbènes (**Duba et Fiori., 2015**) elle contient également 59 à 360 mg/kg acide gallique sur le total des phénols, qui est impliqués dans une large gamme d'activités biologiques, mais sont surtout connus pour leur propriétés antioxydantes (**Rombaut et al., 2015**).

Les principaux polyphénols identifiés dans l'HPR sont les catéchines, les épicatechines, le trans-resvératrol, et procyanidine B1 (**Rombaut et al., 2014; Maier et al., 2009**). La quantité totale de polyphénols, extrait de l'HPR par pressage à froid, est d'environ 2,9 mg / kg ; dont des quantités mineures de catéchine et d'épicatechine est de 1,3 mg / kg pour chacune et de trans-resvératrol est de 0,3 mg / kg (**Maier et al., 2009**).

Lipophilic constituents

Fatty acids (FA)

Mono Unsaturated-FA (MUFA) 18:1n-9, oleic acid



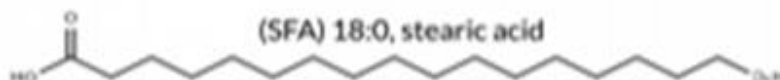
Poly Unsaturated-FA (PUFA) 18:2n-6, linoleic acid



Saturated-FA(SFA) 16:0, palmitic acid

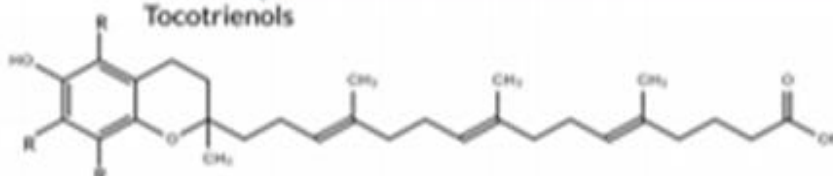


(SFA) 18:0, stearic acid

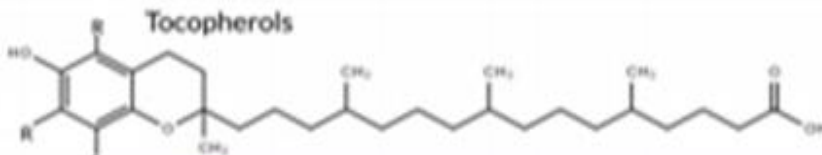


Vitamins e isomers

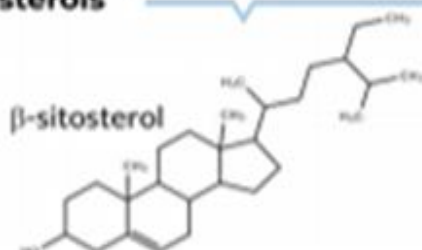
Tocotrienols



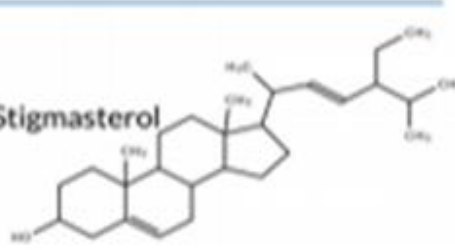
Tocopherols



Phytosterols



Stigmasterol



Hydrophilic constituents

Proanthocyanidin

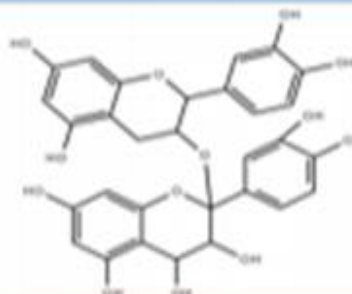


Figure 04 : Structures chimiques des principaux composés de l'HPR

Tableau 1 : Composition du tocophérol et du tocotriénol (mg / kg d'huile) dans les huiles des Pépins de raisin trouvé dans la littérature

(Shinagawa et al., 2015 ; Fernandes et al., 2013 ; Crews et al., 2006 ; Navas., 2009).

	Study 1	Study 2	Study 3		
			France	Italy	Spain
Tocopherols					
α -T	47-56	86-244	18-229	14-160	tr-75
β -T	38-48	nd	nd-109	nd-133	nd-127
γ -T	17-29	3-28	nd-61	nd-119	nd-168
Δ -T	nd-3	tr-1	nd-47	nd	nd-69
Tocotrienols					
α -T3	216-278	69-319	nd-163	nd-352	nd-60
β -T3	.	4-18	nd-67	nd-22	nd-125
γ -T3	482-556	499-1575	nd-500	nd-785	nd-399
Δ -T3	13-17	6-18	nd	nd	nd-82

α -T: alpha-tocopherol; β -T: beta-tocopherol; γ -T: gamma tocopherol; Δ -T: delta tocopherol; α -T3: alpha-tocotrienol; β -T3: beta-tocotrienol; γ -T3: gamma-tocotrienol; Δ -T3: delta-tocotrienol; nd: not detected; tr: trace amount.

Tableau 2 : la composition en phytostérols (mg / kg d'huile) dans l'HPR**(Garavaglia et al., 2016)**

Phytosterols	Content (mg/kg Oil)
Cholesterol	nd–0.10
Cholestanol	nd
Brassicasterol	0.6–0.9
2,4 methylenecholesterol	nd–0.18
Campesterol	0.1–9.3
Campestenol	-
Stigmasterol	10.2–10.8
α -7 campesterol	0.16–0.27
α -52,3 stigmastadienol -	-
Clerosterol	0.90–0.94
β -sitosterol	66.6–67.4
Sitostanol	3.92–4.70
α -5 avenasterol	1.98–2.09
α -52,4 stigmastadienol	0.41–0.47
α -7 estigmastenol	1.99–2.30
α -7 avenasterol	0.98–1.10

Abbreviations: nd, not determined

Les radicaux libres principalement l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont des espèces réactives d'oxygène (ERO). Ces ERO sont produites physiologiquement pour agir comme des molécules de signalisation pour le système immunitaire et la régulation de l'homéostasie. Ce mécanisme est contrôlé par des enzymes antioxydants tel que la catalase, le glutathion peroxydase et le superoxyde dismutase. Une production excessive de ERO entraîne un déséquilibre entre les antioxydants et les ERO, caractérisés par un stress oxydatif, qui est lié aux troubles et maladies chronique tel que les cancers, le diabète de type 2 (DT2), les maladies pulmonaires, cardiovasculaires et neurodégénératives (**Alfadda et Sallam., 2012; Hernández-Jiménez et al., 2009; Raaz et al., 2014**).

Présents dans les fruits, les légumes, le thé, les herbes et les plantes à épices, les antioxydants exogènes tels que les vitamines A, C, E, caroténoïdes et composés phénoliques sont devenus une source efficace d'antioxydants naturels qui réduisent l'oxydation des molécules biologiques en jouant un rôle essentiel dans le maintien de la santé et dans la préservation de la qualité des aliments et des produits cosmétiques (**Bail et al., 2008; Puiggros et al., 2005**).

Les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes lipoxygénase et cyclo-oxygénase, responsables du développement du rancissement oxydatif dans les aliments (**Vinson et al., 2002**).

Par conséquent, comme déjà mentionné, le raisin et ses sous-produits contiennent différents composés phénoliques tels que le resvératrol, la quercétine, procyanidines et autres molécules avec des capacités anti-inflammatoires et anti-oxydantes (**Xia et al., 2010**).

La capacité antioxydante de l'HPR est la propriété bioactive la plus notable des composés phénoliques. Cette propriété a été largement étudiée dans les extraits de graines de raisin dont les composés sont capables de piéger les ERO et d'inhiber l'oxydation des lipides (**Freedman et al., 2001**).

Cette capacité antioxydante élevée est liée à la teneur élevée d'acide gallique, de catéchine, d'épicatéchine, de procyanidines et de des proanthocyanidines dans l'HPR et peut être le résultat de la combinaison synergique de ces composés phénoliques (**Hernández-Jiménez et al., 2009; Khurana et al., 2013**).

Le mécanisme biologique de la propriété antioxydante est associé à l'élimination des ERO principalement le radical hydroxyle ainsi que la chélation des métaux, qui influencent les signalisations cellulaires et le fonctionnement du système immunitaire (**Soobrattee et al., 2005**).

Ce mécanisme est principalement lié à la capacité de l'HPR pour atténuer le stress oxydatif et diminuer les niveaux de lipoprotéines de basse densité (LDL), et ainsi réduire le processus inflammatoire lié à certaines maladies (**Cetin et al., 2008; Sano et al., 2007**).

De même, des données récentes indiquent que l'acide linoléique est un agent naturel anti-inflammatoire pour les cellules mammifères (**Kolar et al., 2019**). Ce dernier est l'acide gras le plus abondant dans la composition de l'HPR. Ainsi que le tocotriénol (isomère de la vitamine E présent dans l'HPR), peut influencer l'inflammation adipeuse liée à l'obésité par évidence dans les lignées cellulaires (**Zhao et al., 2015**).

Les conditions d'inflammation affectent également la résistance à l'insuline et certaines études ont démontré l'influence de l'HPR chez les humains atteints d'insulinorésistance en fonction de la présence des polyphénols et des tocotriénols (**Irandoost et al., 2013; Lai et al., 2014; Shinagawa et al., 2015**).

Inclus dans les phytostérols, le β -sitostérol est également un facteur de prévention contre la libération des modulateurs pro-inflammatoires par les lipoprotéines de basse densité oxydées (LDL) qui stimulent les macrophages au stress oxydatif et à la synthèse des éicosanoïdes (**Shinagawa et al., 2015a, 2015b; Vilahur et al., 2018**).

Concernant l'activité antimicrobienne; nombreuses études ont démontré que l'HPR a des activités antimicrobienne contre certains agents pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (**Garavaglia et al., 2016; Rotava et al., 2009**). En effet; le resvératrol, joue un rôle clé en causant des dommages oxydatifs aux membranes plasmiques des bactéries. Ce

qui fait que l'HPR peut avoir un rôle majeur dans la thérapie antimicrobienne et peut être utilisée comme conservateur naturel des aliments dans l'industrie alimentaire afin d'empêcher la prolifération bactérienne **(Rhodes et al., 2006)**.

Aussi, un lien entre les polyphénols naturels des pépins de raisin et l'activité anticancéreuse est établie. D'après les expériences menées à ce jour sur des cellules et sur des modèles animaux, ces composés peuvent altérer l'expression des gènes ou les voies de signalisation intracellulaires dans les cellules affectées ou saines **(Cheah et al., 2014; Li et al., 2014)**. Certaines données indiquent également des effets antitumoraux des tocotriénols provenant des pépins de raisin **(Choi et al., 2009)**.

Plus récemment, une supplémentation en phytostérol végétal est envisagée dans des expériences anticancéreuses **(Fakih et al., 2018 ; Hutchinson et al., 2019)**.

Concernant les applications cliniques, l'HPR a été utilisée comme base de nanotransporteurs lipidiques pour optimiser l'efficacité thérapeutique des médicaments antitumoraux et minimiser leur toxicité **(Lacatusu et al., 2015)**.

De même, il a été mis en évidence que l'acide linoléique abondant dans l'HPR, peut favoriser la santé cardiovasculaire en abaissant l'adhérence plaquettaire et le taux de cholestérol **(Asadi et al., 2010; Garavaglia et al., 2016 ; Kolar et al., 2019)**. Cette propriété offre à l'HPR un intérêt de consommation en tant que supplément alimentaire chez les personnes souffrant des maladies cardiovasculaires **(Kolar et al., 2019)**.

De plus, des résultats prometteurs ont également été publiés concernant l'activité neuroprotectrice potentielle de l'HPR sur les animaux atteints de la maladie d'Alzheimer **(Berahmand et al., 2020)**.

Finalement, les huiles végétales sont une alternative aux graisses animales en termes d'entretien de la santé et prévention des maladies chroniques comme agent cardioprotecteur. Les extraits de pépins de raisin ont déjà été utilisés en combinaison avec des suppléments d'huile pour soulager l'hyperlipidémie postprandiale **(Fernández-Iglesias et al., 2014)**. L'acide linoléique (AL) contenu dans l'HPR est essentielle dans l'alimentation humaine, car nous ne pouvons pas la synthétiser, et c'est un précurseur d'autres acides gras, alors nous avons besoin

d'un supplément à cet AGPI. L'apport alimentaire d'AL (n-6) doit tenir compte du rapport des acides gras (AG) n-6 / n-3 (4–5 / 1 recommandé) pour maintenir l'équilibre des AG et éviter les processus d'inflammation (**Calder, 2011 ; Raphael et Sordillo, 2013**). En revanche un excès d'AL est lié à des maladies chroniques via le stress oxydatif en conséquence des dommages intracellulaires causés par l'oxydation des chaînes lipidiques (**Matthäus et Virgin, 2008; Shinagawa et al., 2015**). En outre, il y a des preuves que les acides gras contenus dans l'HPR peuvent être des composés pro-oxydants (**Hurtado de Catalfo et al., 2006; Hurtado de Catalfo et al., 2009**).

Matériels et méthodes

Ce travail a été préalablement réalisé par l'équipe de recherche du laboratoire Physiologie cellulaire, Physiopathologie et Biochimie de la nutrition (Ppabionut).

Pour étudier les effets de l'HPR in vitro sur le statut oxydant/antioxydant, ce travail a été réalisé sur des lymphocytes humaines sur lesquelles l'HPR a été additionner en trois concentrations différentes dont C1, C2 et C3 qui correspond à 4 µg/ml, 8 µg/ml et 25 µg/ml respectivement.

1. Extraction de matériel végétal (pépins de raisin)

Les pépins de raisin récupérés des déchets du processus de fabrication vinicole étaient rincés et séchés à l'obscurité, après ils ont été réduit en poudre à l'aide d'un mortier et conservés à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

2. Epuisement des pépins de raisin avec l'éthanol:

L'opération consiste à épuiser le matériel végétal au contact d'un solvant. L'extrait de pépins de raisins à analyser a été obtenu comme suit:

Dans un ballon à Soxhlet, 10g de matériel végétal sont ajoutés à 60 ml d'éthanol. L'ensemble est porté pendant une heure. Le mélange est ensuite filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests.

Dans une fiole : 10g de matière végétale sont ajoutés à 60 ml d'éthanol, la préparation a été mise sur une plaque chauffante pendant 48h, après filtration, le filtrat est récupéré.

3. Isolement des lymphocytes humains:

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin d'hommes volontaires, par centrifugation dans un gradient d'Histopaque (Sigma). L'histopaque, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle d'histopaque se trouvent à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée.

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi. Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée «Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de 4.10⁶ cellules/ml.

4. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT:

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée).

La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN (Mosmann, 1983).

La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazoliumbromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière.

Après isolement des lymphocytes, une suspension cellulaire de 4×10^6 cellules/ml sert à la préparation de la gamme étalon suite à différentes dilutions.

5. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes:

5.1 Mesure de la Lactate déshydrogénase libérée dans les lymphocytes:

La mesure de l'activité de l'enzyme LDH (lactate déshydrogénase) dans le milieu de culture après les différentes incubations représente un marqueur de l'endommagement des cellules. L'augmentation de l'activité de cette enzyme dans le surnageant des cultures des cellules permet de détecter une altération de la perméabilité membranaire et par conséquent une mesure de la cytotoxicité. La détection colorimétrique de la sécrétion de la LDH se fait par le kit LDH (SIGMA-ALDRICH) dont le principe suit deux étapes. Dans une première étape, la LDH catalyse la réduction du NAD^+ en NADH et H^+ par l'oxydation du lactate en pyruvate.

Dans une seconde étape de la réaction, la LDH utilise le NADH et H^+ formés pour catalyser la réduction du sel de tétrazolium en un précipité hautement coloré qui absorbe à 450 nm. La quantité de précipité «formazan» produite est proportionnelle à la quantité de LDH libéré dans le milieu de culture.

5.2 Détermination des taux en Glutathion réduit des lymphocytes:

Les taux en Glutathion réduit (GSH) sont mesurés par une méthode colorimétrique suivant le protocole du Kit BIOXYTECH GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). Les lymphocytes sont suspendus dans l'acide métaphosphorique (5%, P/V). Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, le surnageant est mélangé au tampon phosphate de potassium contenant l'acide diethylene triamine, Penta-acétique et le lubrol (PH 7,8). Le chromogène est par la suite ajouté dans le milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 25°C pendant 10min à l'abri de la lumière. La lecture se fait à 400 nm. Les concentrations en GSH sont obtenues grâce à un courbe étalon préparé avec le GSH standard.

5.3 Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes:

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974). En présence de la Catalase (CAT), la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps. Après incubation, les concentrations du H₂O₂ restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H₂O₂. La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité/ ml ou en Unité/mg de protéine.

5.4 Teneurs en Malondialdéhyde des lymphocytes:

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé au niveau du lysat lymphocytaire en utilisant l'acide thiobarbiturique selon la méthode de Draper et Hadley (1990).

5.5 Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes:

Les protéines carbonylées (PCAR) (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées dans le lysat lymphocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de

Levine et al. (1990). La réaction aboutit à la formation de la dinitrophényl hydrazone colorée. La concentration des groupements carbonyles est déterminée par lecture à des longueurs d'onde de 350 et 375 nm.

6. Analyse statistique:

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA.

Résultats et interprétations

1. Effet de l'HPR sur le nombre total des lymphocytes (NLT%) : (Figure 05)

Au début de l'expérience, la prolifération basale (Pb) des lymphocytes était à 100% (conditions normaux).

Après l'addition du Concanaline A (Con A) qui est un agent mitogène spécifiques des lymphocytes T, leur nombre a augmenté d'une manière exponentielle jusqu'à 191,44%.

En présence de l'oxydant; dans notre cas H_2O_2 le NLT a diminué d'une manière hautement significative jusqu'à 66,84% comparé à la PB + Con A.

A l'ajout de l'HPR à une concentration C3 au milieu de culture contenant les lymphocytes + Con A + H_2O_2 , le NLT a augmenté d'une manière hautement significative comparé à la Pb + Con A + H_2O_2 .

Cependant, la prolifération des lymphocytes est réduite d'une manière hautement significativement par cet extrait à une concentration C2. Mais cette réduction s'apparait non significative à C1 par rapport à C3 et C2.

2. Effet de l'HPR sur le taux de la LDH dans les lymphocytes : (Figure 06)

La teneur de LDH lymphocytaires diminue en présence de l'agent mitogène (Con A) par rapport à la prolifération basale.

A l'ajout du H_2O_2 , le taux de LDH lymphocytaire a augmenté d'une manière exponentielle comparé à la prolifération basale.

En ajoutant une concentration C3 d'HPR au milieu de culture contenant les lymphocytes, le Con A et l' H_2O_2 , on a constaté une réduction significative du taux d'LDH lymphocytaire.

La concentration C2 a marqué une augmentation significative du LDH, ainsi que C1 provoque une augmentation hautement significative du LDH.

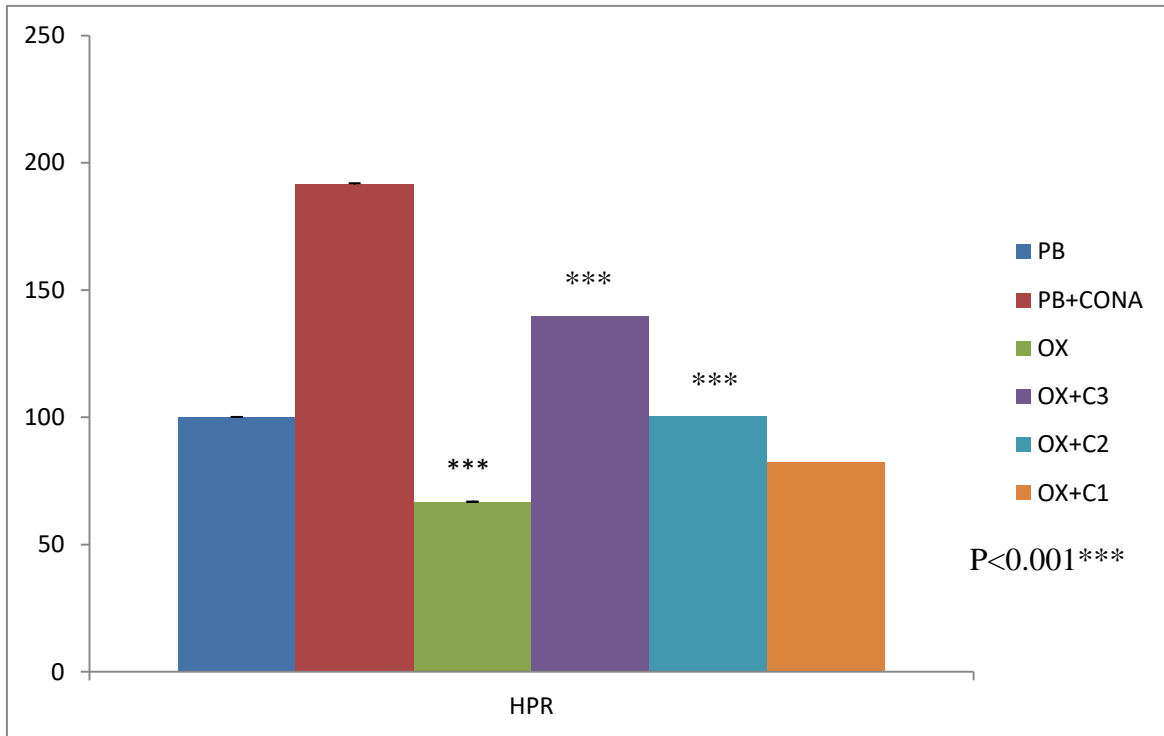


Figure 05 : Effet de l'HPR sur le nombre total des lymphocytes (NLT%)

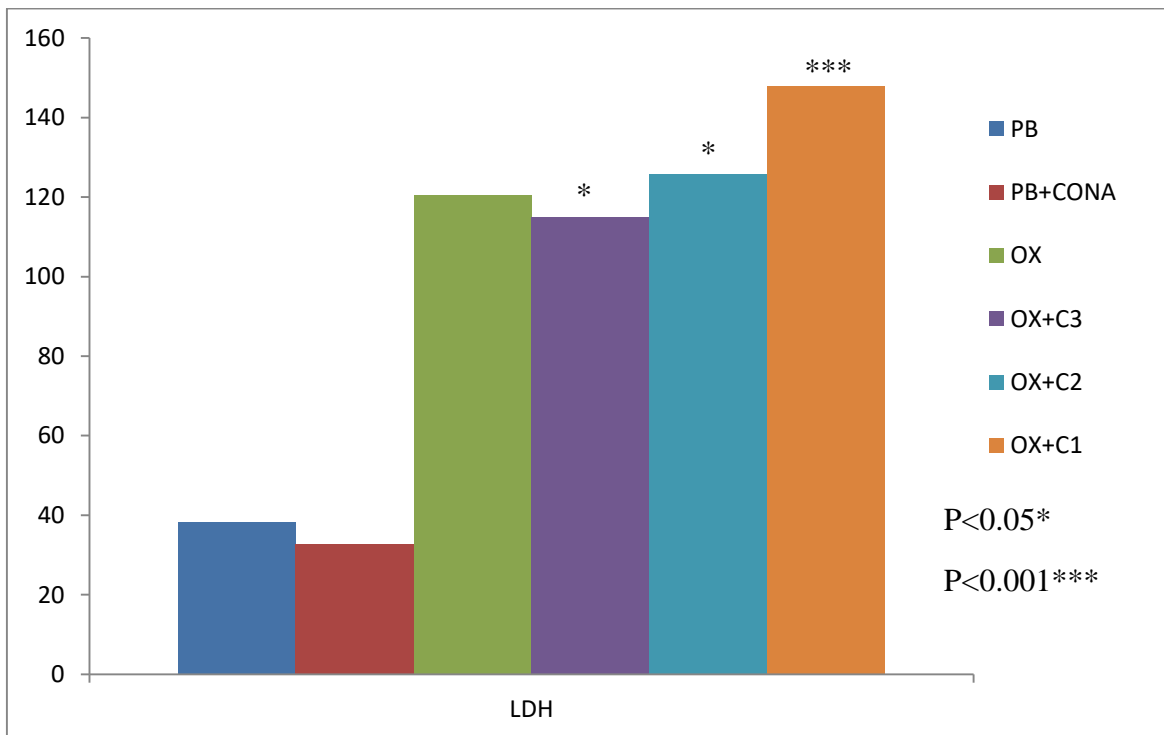


Figure 06 : Effet de l'HPR sur le taux de la LDH: Lactate déshydrogénase dans les lymphocytes

3. Effet de l'HPR sur le statut anti-oxydant des lymphocytes

3.1. Effet de l'HPR sur le taux du GSH lymphocytaire : (Figure 07)

Les teneurs lymphocytaires en GSH augmentent en présence de l'agent mitogène (Con A) comparées à la prolifération basale.

En présence de l'agent oxydant H₂O₂, l'activité enzymatique du GSH a diminuée d'une manière hautement significative, cette diminution est non significative à la concentration C3 et significative à C2 d'HPR.

En revanche, une concentration C1 d'HPR montre une augmentation hautement significative de l'activité du GSH.

3.2. Effet de l'HPR sur l'activité de la CAT dans les lymphocytes : (Figure 08)

L'activité enzymatique de la CAT au niveau des lymphocytes augmente en présence d'agent stimulant (Con A) comparée à la prolifération basale. Cependant, les résultats montrent une diminution hautement significative de l'activité de la CAT en présence d'OX.

Ainsi, qu'aux une concentration C3 et C2 de l'HPR, la CAT a augmenté d'une manière hautement significative.

En revanche, l'activité de la CAT lymphocytaire à C1 a diminué d'une manière hautement significativement.

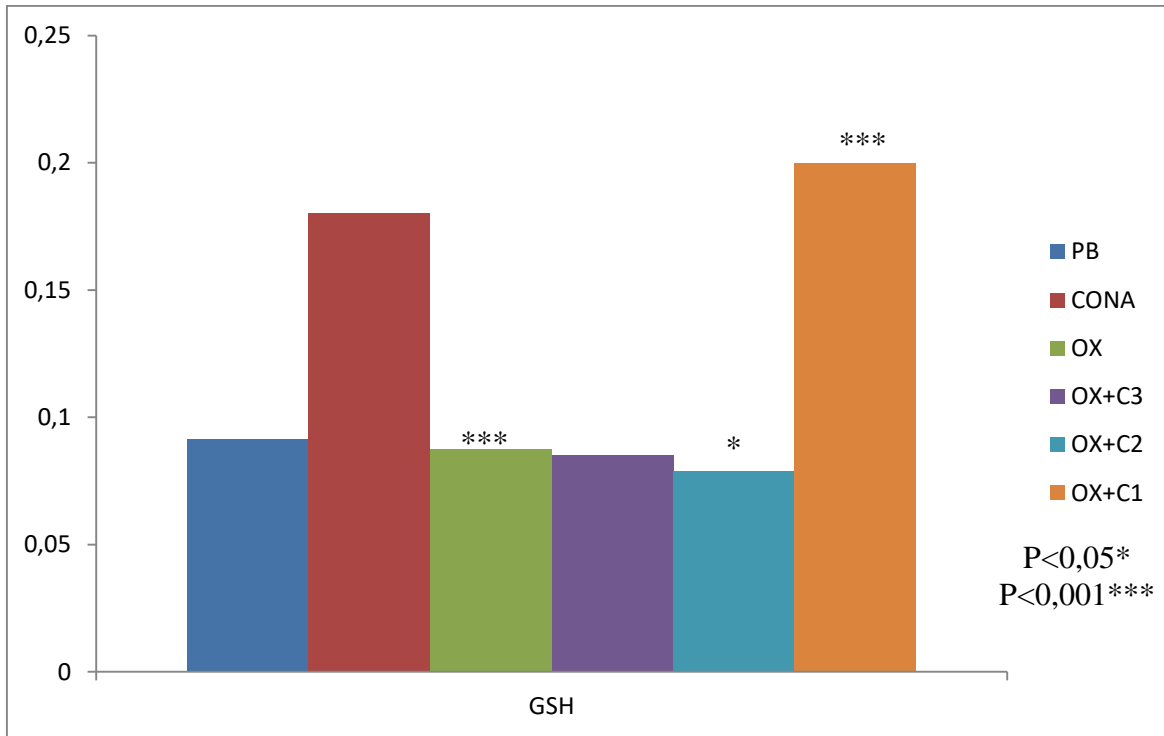


Figure 07: Effet de l'HPR sur le taux du GSH: Glutathion réduit lymphocytaire

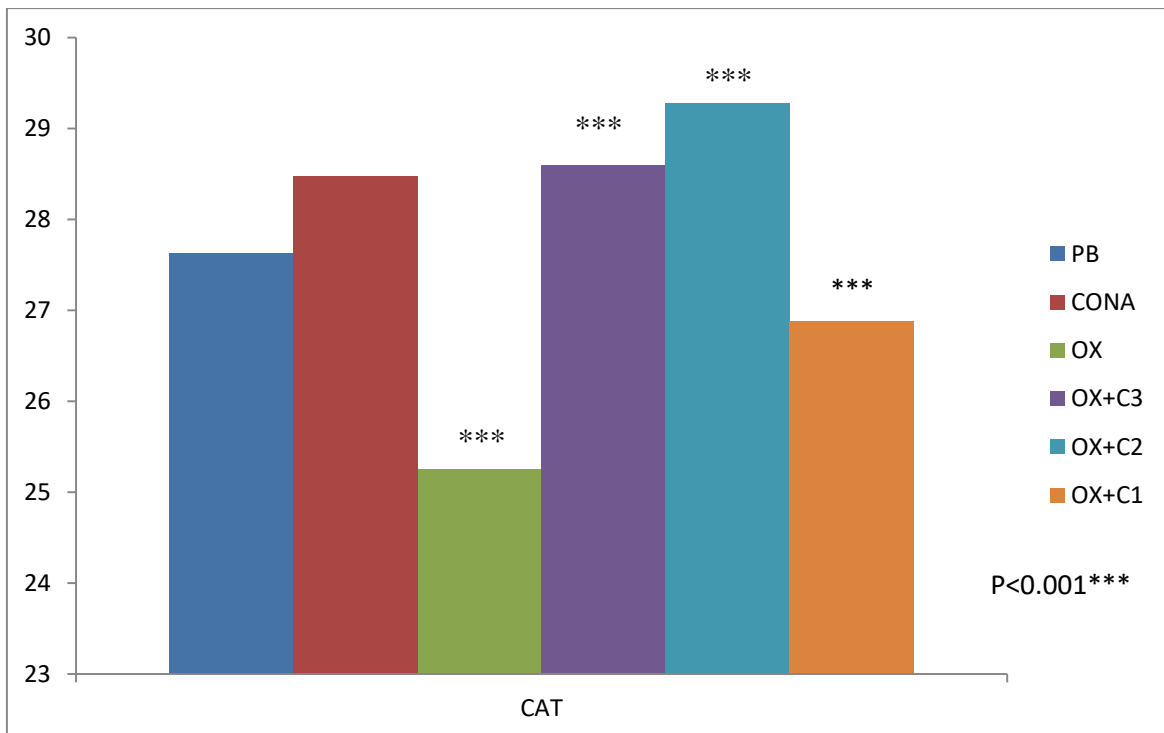


Figure 08: Effet de l'HPR sur l'activité de la CAT: Catalase dans les lymphocytes

4. Effet de l'HPR sur le statut oxydant:

4.1 Effet de l'HPR sur les teneurs des lymphocytes en MDA: (Figure 09)

Les teneurs lymphocytaires en MDA soit à la prolifération basale ou après l'ajout de Con A, ne varient pas.

Cependant, la teneur en MDA est diminuée très significativement à la concentration C3.

Par ailleurs, une augmentation hautement significative a été observée au niveau des teneurs lymphocytaires en MDA en présence de l'HPR à C2 et à C1.

4.2 Effet de l'HPR sur les teneurs lymphocytes en PCAR: (Figure 10)

Les résultats montrent que la teneur lymphocytaire en PCAR augmente en présence de l'agent mitogène comparé à la prolifération basale.

L'agent oxydant H₂O₂ a marqué une réduction hautement significative du PCAR

Cependant, à une concentration C3 la teneur en PCAR a diminuée significativement.

Par ailleurs, une augmentation hautement significative a été observée au niveau des teneurs lymphocytaires en PCAR en présence de la concentration C1 de l'HPR.

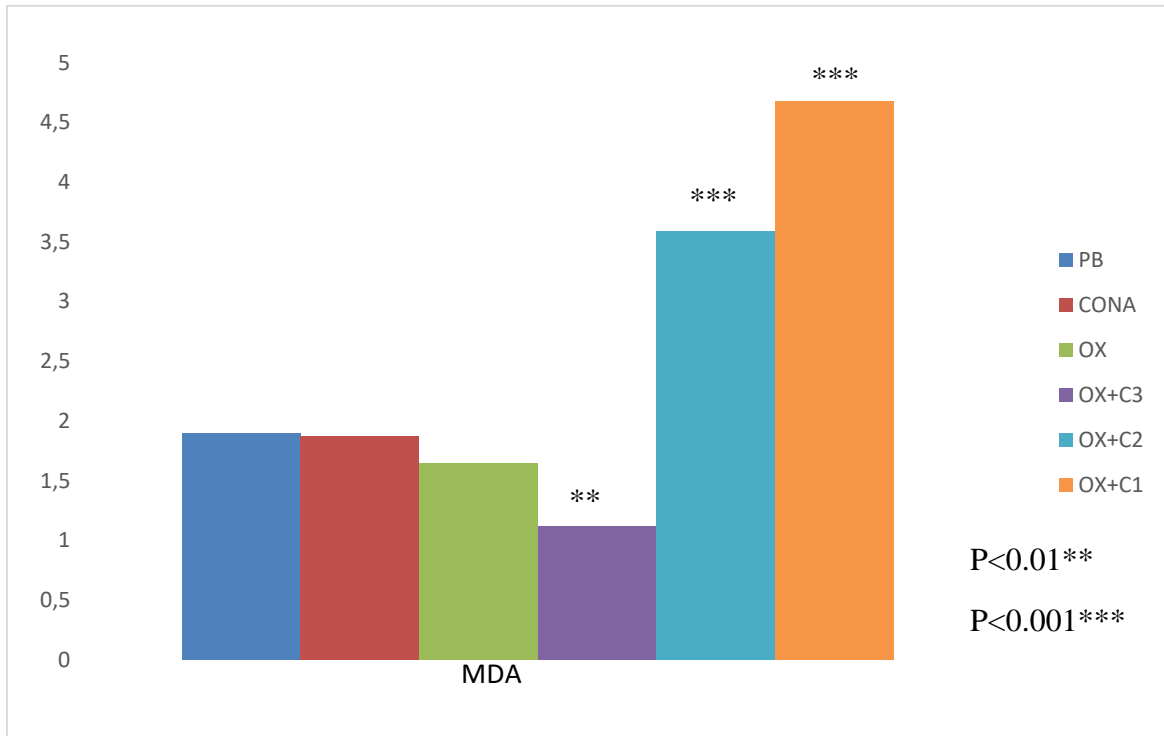


Figure 09: Effet de l'HPR sur les teneurs des lymphocytes en MDA : Malondialdéhyde

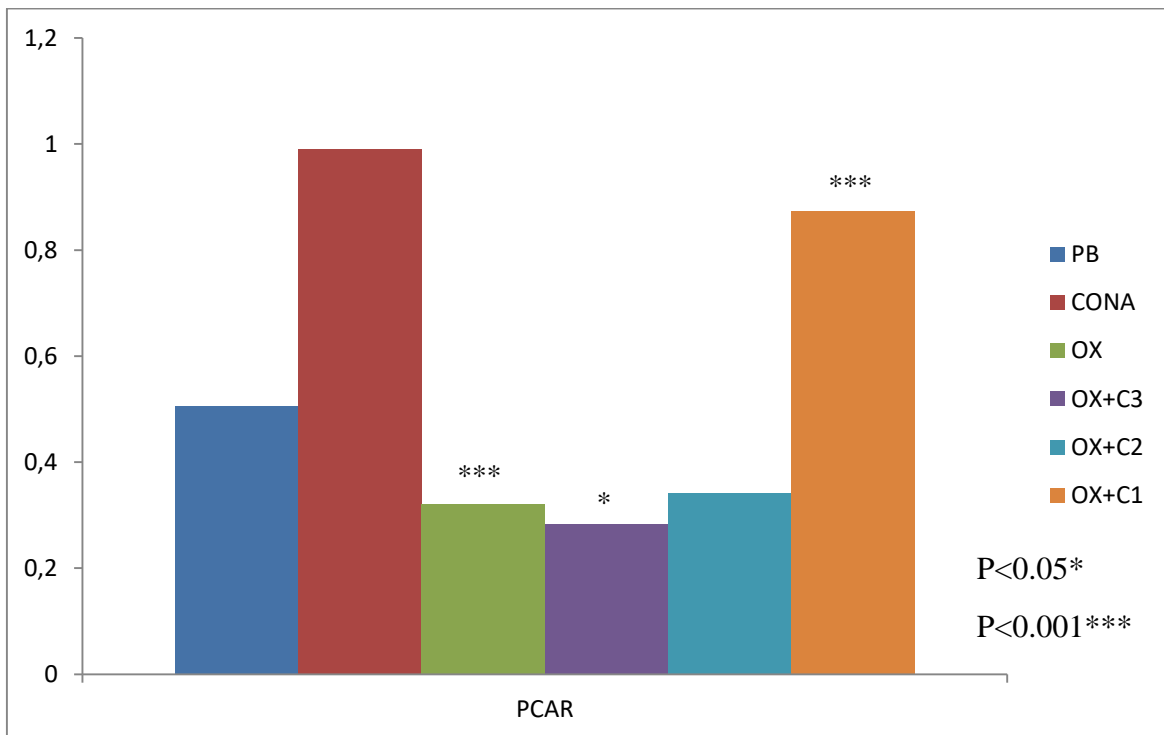


Figure 10: Effet de l'HPR sur les teneurs lymphocytes en PCAR : Protéine carbonylée

Discussion

Le stress oxydatif est lié à plusieurs maladies dégénératives telles que le cancer, maladies cardiaques et autres maladies chroniques. Ceci s'explique par la capacité des ERO à endommager les constituants cellulaires y compris les protéines, les lipides et l'ADN.

Cependant, pour lutter contre les dommages générés par ces ERO, les humains ont évolué avec des systèmes de défense antioxydants, dont le système de défense comprennent principalement des enzymes antioxydants telles que la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (CAT), qui métabolisent l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques, empêchant ainsi la plus grande partie de la formation de substances toxiques HO· et le superoxyde dismutase (**Ishige et al., 2001; Ma et al., 2006**).

Cependant, ce système de défense enzymatique ne couvre pas la capacité antioxydante de l'organisme, et l'HPR est considéré comme un très puissant antioxydant exogène en raison de sa richesse en molécules bioactives qui ont un grand pouvoir de piégeage des ERO, notre étude a pour but d'évaluer la capacité antioxydante de l'HPR à une certaine concentration sur le statut oxydant des lymphocytes humaines en mesurant les taux du lactate déshydrogénase (LDH) comme paramètre d'agression cellulaire, du malonyldialdéhyde (MDA) comme indice de la peroxydation lipidiques, et les protéines carbonylés (PC) comme paramètre de l'oxydation des protéines. Aussi, le statut antioxydant a été évalué les taux du GSH et de la CAT.

La LDH est un marqueur de lésions des tissus. Cette enzyme est normalement contenue dans la plupart des tissus de l'organisme, et seulement en faible quantité dans le sang. Lorsque les tissus sont endommagés, les cellules libèrent la LDH entraînant une augmentation de sa concentration dans le sang. Nos résultats ont montrés une augmentation de la LDH après l'ajout de l'oxydant (H₂O₂), puis une diminution après l'addition de l'HPR à une concentration C3.

En 2008, Une étude effectuée par (**Sehirli et al.,**) a été conçue pour déterminer l'effet protecteur possible de l'extrait de pépins de raisin (EPR), un complément alimentaire antioxydant largement utilisé, sur les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) hépatique.

L'I/R a provoqué une augmentation significative de l'activité LDH mais après un traitement à l'EPR cette augmentation a complètement inversée, ceci démontre que l'EPR a réduit les lésions organiques induites par l'I/R grâce à sa capacité à équilibrer le statut oxydant-

antioxydant, à inhiber l'infiltration des neutrophiles et à réguler la libération de médiateurs inflammatoires.

Une autre étude qui a pour but d'évaluer l'effet protecteur de l'EPR contre les lésions oxydatives du foie et la fibrose induite par l'obstruction biliaire chez le rat. Pour cela, le taux sérique du LDH chez des rats ligaturés des voies biliaires et des rats traités à l'EPR a été déterminé pour évaluer respectivement la fonction hépatique et les lésions tissulaires, ils ont observé que le LDH était élevée dans le groupe ligaturé et était significativement diminué avec le traitement par EPR.

D'après ces résultats ils suggèrent que l'EPR protège le foie des dommages oxydatifs suite à la ligature des voies biliaires chez le rat. Cet effet implique éventuellement l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles. Ainsi, la restauration du statut oxydant et antioxydant dans les tissus (**Dulundu et al .,**).

De plus, La fibrose pulmonaire est un effet secondaire courant de la bléomycine, un agent chimiothérapeutique, et les preuves actuelles suggèrent que les ERO jouent un rôle clé dans le développement des lésions pulmonaires. L'étude de référence à eux comme objectif d'examiné si l'EPR, un mélange polyphénolique présentant des propriétés antioxydantes, est capable de protéger les cellules contre le stress oxydatif et les lésions pulmonaires induits par la bléomycine. Les résultats ont démontré une augmentation de la LDH après traitement par la bléomycine. En revanche, l'administration de l'EPR a efficacement contrecarré ce facteur d'agression cellulaire et les changements biochimiques et morphologiques du tissu pulmonaire.

D'après les résultats obtenues les auteurs suggèrent que l'EPR exerce de puissantes propriétés antioxydantes qui pourraient trouver une application potentielle dans la protection contre la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (**Khazri et al.,**).

Les radicaux libres perturbent l'homéostasie cellulaire par peroxydation des lipides membranaires, oxydation des protéines et formation d'adduits sur l'ADN, ce qui conduit finalement à la mort cellulaire si les dommages dépassent la capacité de la défense oxydative de la cellule. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs (**Ohshima et al., 1998 ; Sirinivasan et al., 2002**).

La membrane cellulaire est connue pour être une cible pour les ERO principalement l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. La dégradation membranaire résulte essentiellement de l'attaque de ces ERO sur les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides qui entraînent la formation de MDA (**Tominaga et al., 2004**)

Le MDA est un métabolite toxique et mutagène produit par la peroxydation lipidique et par la biosynthèse des prostaglandines, sa mesure est largement utilisée comme indicateur de la peroxydation lipidique (**Prasad et al., 2006**). Nos résultats ont démontrés une augmentation du MDA après l'ajout du H₂O₂ a milieu prolifératif suivie d'une diminution après l'ajout de concentration C3 de l'HPR .

Nos résultats sont en accord avec une étude de (**Miroslava et al., 2008**) sur les lymphocytes humains qui a démontré qu'une concentration de (2,5 µg/mL) d'HPR exerce un effet bénéfique sur les cultures des lymphocytes humains en réduisant la production de MDA; ces résultats indique que l'HPR diminue la peroxydation lipidique des lymphocytes.

Dans la même année, une autre étude (**Enginar et al**) est effectuée sur des rats exposés aux rayons pour mettre en évidence l'effet de l'extrait de pépin de raisin sur la peroxydation lipidique des lymphocytes du sang en comparant avec la vitamine E. Les résultats indiquent que l'HPR a amélioré le statut antioxydant et a diminué l'incidence de la peroxydation lipidique induite par les ERO dans des échantillons du sang de rats exposés aux rayons X.

Les résultats de cette étude ont suggérés que l'effet antioxydant de l'HPR administrée aux animaux était plus efficace que la vitamine E administrée avant l'irradiation du corps entier chez le rat. La concentration de MDA dans le groupe traité par HPR s'est avérée significativement plus faible que dans le groupe témoin. Lorsque la concentration de MDA du groupe témoin a été comparée au groupe traité par la vitamine E elle était diminuée mais cette diminution était plus petite que dans le groupe traité par l'HPR par rapport au groupe témoin.

De plus, le stress oxydatif résulte d'une production accrue d'ERO après l'intoxication au tétrachlorure de carbone (CCl₄) qui peut jouer un rôle important dans la dégénérescence des tissus (**Szymonik-Lesiuk et al., 2003**). Le mécanisme moléculaire sous-jacent aux effets toxiques du CCl₄ implique la peroxydation lipidique provoquée par les ERO qui sont générés pendant son métabolisme. Une peroxydation lipidique élevée peut entraîner un stress oxydatif

lorsque les défenses antioxydantes sont dépassées. Ceci est particulièrement important dans le cerveau qui est un organe dont le fonctionnement repose principalement sur le métabolisme aérobie, en conjonction avec sa teneur élevée en lipides insaturés et le manque de régénération neuronale, qui le rend très sensible aux dommages oxydatifs (**Dani et al., 2008; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006; Lee et al., 2012; Yao et Keshavan, 2011**).

La peroxydation des phospholipides membranaires finissent par entraîner une perte d'intégrité membranaire et à la mort cellulaire.

Les données ont révélé que le prétraitement de l'HPR a montré une correction des effets nocifs des irradiations et du CCl₄ sur le statut antioxydant dans les tissus cérébraux. Le prétraitement avec de l'HPR à des rats intoxiqués irradiés et à CCl₄ démarré une diminution des niveaux de peroxydation lipidique, ce qui met en évidence la propriété antioxydante de l'HPR (**Feng et al., 2005**).

L'effet protecteur de l'HPR contre l'oxydation induite par CCl₄ et la production des lipides peroxydés en corrélation avec l'activité de piégeage direct vers les radicaux peroxydes à la fois dans la membrane et en phase aqueuse. L'HPR réduit l'incidence des lipides peroxydés induites par les ERO dans le système nerveux central des rats âgés et une réduction des lésions cérébrales hypoxiques ischémiques chez les rats nouveau-nés (**Feng et al., 2005**).

Ainsi, cela pourrait réduire la production des ERO, ce qui peut être lié à l'amélioration du statut antioxydant dans le système nerveux central (**Balu et al., 2006**) L'activité antioxydante de l'HPR vis-à-vis des radicaux hydroxyles est attribuée à ses quantités élevées d'acides gras essentiels, qui sont nécessaires pour la production de prostaglandines et à sa teneur élevée en polyphénols, acide gallique, catéchine, procyanidines et en vitamine (**Busserolles et al., 2006; Maier et al., 2009; Natella et al., 2002**).

Par ailleurs, les procyanidines, la catéchine et l'acide gallique se sont révélés être de bons agents de prévention cellulaire contre les dommages oxydatifs de l'ADN et de l'apoptose via l'induction d'enzymes antioxydants endogènes (**Bagchi et al., 1998; Morin et al., 2008; Recknagel et al., 1989**).

Nous avons évalué la capacité de l'HPR dans la réduction du taux de protéine carbonylée (PCAR) sur des lymphocytes traités par l'H₂O₂, le PCAR est l'un des marqueurs les plus couramment trouvés sur les dommages oxydatifs des protéines. Il constitue un marqueur stable extrêmement fiable de l'oxydation des protéines. Ainsi, nos résultats montrent qu'une concentration C3 reste la plus efficace sur l'oxydation des protéines dans les lymphocytes.

En 2012, une étude (**Postescu et al.,**) a montré que l'administration à long terme du dérivé d'anticycline qui est la Doxorubicine (DOX), provoque une cardiotoxicité cumulative dose-dépendante (**Minotti et al.,2004;Signal et al.,2000;Vander Heide et al.,2009**). Le mécanisme de cet effet secondaire dommageable induit par Dox est attribué à la génération de ERO, conduisant à un stress oxydatif et à la stimulation subséquente de l'oxydation des lipides et de l'oxydation des protéines (**Granados-Principal et al., 2010; Zhou et al.,2001**).

L'ajout d'extrait des pépins de raisin aux cellules normales a exercé un effet cytoprotecteur suite au traitement oxydatif avec Dox. Le produit a nettement inhibé la formation de PCAR, les deux produits étant des marqueurs appropriés pour le stress oxydatif. Le pouvoir antioxydant de l'extrait était dose-dépendant car la survie cellulaire augmentait, tandis que les niveaux des protéines carbonylées ont diminué en augmentant la teneur en polyphénols de l'extrait. En revanche, dans les cellules tumorales, un tel traitement a entraîné l'effet inverse, la mort cellulaire, la teneur en protéine carbonylée a augmenté avec l'amélioration de la dose d'extrait de raisin. Par conséquent, l'activité antioxydante de l'EPR a été affirmée par sa capacité différentielle à prévenir la toxicité Dox, les dommages oxydatifs des protéines dans les cellules normales mais pas dans les systèmes tumoraux.

Aussi, une importante diminution de la densité de charge de surface membranaire dans les érythrocytes chez les rats âgés par rapport aux érythrocytes de jeunes rats a été notée dans une étude de (**Sangeetha et al.,**). Cette diminution pourrait être due à l'augmentation d'oxydation des protéines conduisant à des formations de produits carbonylés au niveau des érythrocytes des rats âgés. Cependant, une supplémentation en EPR présente une diminution du niveau des protéines carbonylées ainsi qu'une augmentation du statut antioxydant chez les rats âgés sous traitement. Donc l'EPR est considérée comme un supplément anti-âge efficace pour prévenir la perte de charge de surface membranaire associée au stress oxydatif et au vieillissement, ce qui pourrait maintenir l'intégrité de fonctions des membranes érythrocytaires chez les personnes âgées.

La peroxydation des phospholipides membranaires finit par entraîner une perte d'intégrité membranaire et à la mort cellulaire, ces changements entraînent une modulation des défenses enzymatiques antioxydants des tissus (**Lavrentiadou et al., 2013; Maier et al., 2009**).

Comme nos résultats montrent, une concentration C1 de l'HPR ajoutée aux lymphocytes endommagés par H₂O₂ a favorisé un taux élevé de GSH, le principal antioxydant non-enzymatique pour décomposer H₂O₂, ou un peroxyde organique (ROOH) en eau/ou alcool. La résistance de nombreuses cellules contre le stress oxydatif est associée à un taux intracellulaire élevé de GSH (**Navarro et al., 1999**). Ce dernier agit directement comme un capteur des ERO en neutralisant le radical hydroxyle (HO•), restaurant les molécules endommagées par le don d'hydrogène, réduisant les peroxydes et en maintenant les thiols des protéines dans le état réduit (**Halliwell, 2001 ; Sies, 1986**).

Une étude publié en 2007 (**Enginar et al**) a démontré que l'irradiation du corps entier chez les rats a causé des dommages dans les lymphocytes sanguines, tel qu'évalué par une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution des niveaux de GSH. Les concentrations de GSH ont augmenté dans les groupes traités par l'HPR et les groupes traité par la vitamine E mais les augmentations dans ces groupes n'étaient pas identiques. Le niveau de GSH dans le groupe HPR s'est avéré significativement plus élevé dans le groupe vitamine E et témoin respectivement, et il y avait une différence significative entre eux, alors l'HPR s'est avérée plus efficace que la vitamine E.

Le système de défense antioxydant inhérent à la cellule, y compris la GSH et la CAT, contrecarrent de manière compétitive le stress oxydatif. Il a été montré que l'HPR (à une concentration de 2,5 µg/mL) piège les radicaux de l'anion superoxyde et inhibe la peroxydation lipidique dans les lymphocytes humains (**Miroslava et al., 2008**).

La CAT est l'une des enzymes antioxydants endogènes les plus efficaces, elle protège les cellules contre le peroxyde d'hydrogène. Même bien qu'elle ne soit pas essentiel pour certains types de cellules dans des conditions normales, elle joue un rôle important dans l'acquisition de la tolérance au stress oxydatif et dans la réponse adaptative des cellules (**Hunt et al., 1998**).

Notre étude a marqué qu'une concentration C2 d'HPR favorise une augmentation significative du taux de la CAT dans les lymphocytes oxydés par l' H_2O_2 .

Diverses études d'intoxication au CCl_4 avaient démontré que ce dernier provoque la génération des ERO dans de nombreux tissus y compris le cerveau (**Ismail et al., 2014; Szymonik et al., 2003**). Des études antérieures ont confirmé que les activités du GSH et la CAT ont été diminués, accompagnée d'une élévation du taux des MDA en raison de la toxicité du CCl_4 .

La baisse observée des activités de la catalase et de la GPx (enzyme qui agit en conjonction avec le GSH) dans le cerveau des rats irradiés et intoxiqués au CCl_4 ainsi dans notre étude est liée par la perte de leur capacité à détoxifier l' H_2O_2 , cependant l'accumulation de H_2O_2 , inhibe leurs activités. De plus, la diminution des activités du CAT enregistrée dans la présente étude serait due à la fuite de l'enzyme des cellules blessées qui ont été exposées au stress oxydatif dans le sang (**Usoh et al., 2005**). La diminution significative de l'activité GPx cérébrale des rats irradiés et intoxiqués au CCl_4 pourrait être attribuée à son inactivation par les sous-produits de la peroxydation lipidique (**Sies et al., 1991**) ou à la diminution de la concentration du GSH, telle qu'observée dans les études précédentes in vitro et in vivo (**Halliwell., 2001; Reiter et Wendel 1982**).

Une expérience est effectuée par (**Ismail et al., 2016**) pour examiner l'effet de l'HPR sur les lésions hépatiques aiguës induites par le CCl_4 chez des rats irradiés provoquant une atténuation des enzymes antioxydants endogènes, induction de réponses inflammatoires, déclin de la fonction hépatique, et donc évoqué l'apoptose et la mort cellulaire (**Basu, 2003; Karbownik et Reiter, 2000**).

De plus, les résultats de la présente étude ont révélé que le stress oxydatif induit par l'irradiation et le CCl_4 a déclenché l'épuisement du statut antioxydant dans les cellules hépatiques et inhibition des enzymes antioxydants; les activités de la CAT, GSH-Px, GST (Glutathion-S-transférase) et épuisement du niveau de GSH en parallèle avec une augmentation marquée des niveaux de MDA.

En revanche, le traitement par l'HPR a favorisé des améliorations significatives dans les niveaux de MDA, les activités des enzymes antioxydants et la teneur en GSH, par rapport aux groupes intoxiqués.

Conclusion

Le raisin est parmi les cultures fruitières les plus répandus dans le monde avec une production annuelle approximative de 58 millions de tonnes métriques, la grande partie de cette production subit des processus de vinification, le marc se forme là où les graines représentent une partie des résidus solides.

Dans le passé, le marc de raisin était généralement jeté et a provoqué des problèmes environnementaux, alors que de nos jours, grâce à nombreuses études qui ont mis en évidence la valorisation de ce marc en raison de sa richesse en composés biologiquement actifs, il a été de plus en plus utilisé.

Les pépins de raisin représentent la portion majeure du marc, leur teneur en huile est élevée ce qui offre une voie de valorisation alternative pour ce sous-produit.

En plus de ses caractères organoleptiques idéals, les études in vitro ont confirmés que l'huile des pépins de raisin représente divers activités biologiques ; antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire..., ces activités sont principalement liées à sa composition en acides gras mono et polyinsaturés, les polyphénols et les vitamines liposolubles principalement la vitamine E.

Parmi les propriétés les plus connues de l'huile des pépins de raisin ; la propriété antioxydante à laquelle nous nous sommes intéressés dans notre étude.

En effet notre étude était effectuée in vitro sur les lymphocytes humains dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'HPR.

Le but de notre travail était de modéliser une concentration de l'huile des pépins de raisin pour un pouvoir antioxydant considérable.

Pour cela, nous avons mesuré le taux du lactate déshydrogénase dans les lymphocytes en tant qu'un marqueur d'agression cellulaire avant et après l'ajout des trois concentrations respectivement et on a constaté que la concentration C3 marque une diminution significative du lactate déshydrogénase.

Ensuite, on a apprécié la capacité de défense antioxydante endogène des lymphocytes en mesurant le taux du GSH et de la catalase et on a constaté que la concentration C1 et C2 augmentent le taux du GSH et de la catalase respectivement.

De plus on a analysé les dommages cellulaires induite par l'oxydation en mesurant le taux du malondialdéhyde comme marqueur de la peroxydation des lipides et le taux des protéines carbonylés comme marqueur d'oxydation protéique, et on a constaté que la concentration C3 permet une réduction considérable de ces marqueurs.

Et pour conclure nos résultats étaient remarquables sur le pouvoir antioxydant de l'HPR mais ce pouvoir est toujours dépendant de la concentration (dose-dépendant)

La majorité des études ainsi que notre étude sur l'évaluation de la capacité antioxydante de l'huile des pépins de raisin sont exécutés in vitro.

Il paraît intéressant d'effectuer des études in vivo sur les rats par exemple, puisque le stress oxydatif est la principale cause des maladies chroniques comme le diabète, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives.... On peut facilement provoquer les différentes pathologies aux rats et évaluer l'activité de l'HPR administrée à différentes doses.

Références bibliographiques

Abarghuei, M.J., Rouzbehan, Y., Alipour, D. (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livest. Sci.* 132, 73–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2010.05.002>.

Aebi H (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie GmbH. Weinheim. 26:673–684.

Alfadda, A.A; Sallam, R.M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 936486.

Asadi, F., Shahriari, A., Chahardah-Cheric, M. (2010). Effect of long-term optional ingestion of canola oil, grape seed oil, corn oil and yogurt butter on serum, muscle and liver cholesterol status in rats. *Food Chem. Toxicol*, 48, 2454–2457.

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M; Bagchi, D.J; Balmoori, J; Stohs, S.J. (1998). Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice, *Gen. Pharmacol*, 30, 771–776. doi: 10.1016/s0306-3623(97)00332-7.

Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., Buchbauer, G. (2008). Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem.* 108, 1122–1132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>.

Ballesteros-Vivas, D; Álvarez-Rivera, G; Ibáñez, E.; Parada-Alfonso, F.; Cifuentes, A. (2019). Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seeds combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr*, 1595, 144–157.

Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., Panneerselvam, C. (2006). Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats, *Brain Res. Bull.* 68: 469–473.

- Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients, *Toxicology* 189 (2003) 113–127.
- Baydar, N.G., Özkan, G., Cetin, E.S. (2007). Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites* 58, 29–33, <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.5>.
- Baydar, N.G., Sagdic, O., Ozkan, G., Cetin, S. (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *International Journal of Food Sciences and Techniques*, 41, 799e804.
- Berahmand, F., Anoush, G., Hosseini, M.J., Anoush, M. (2010). Grape Seed Oil as a Natural Therapy in Male Rats with Alzheimer's Diseases. *Adv. Pharm. Bull*, 10, 430–436.
- Böger, B.R; Salviato, A.; Valezi, D.F.; Di Mauro, E.; Georgetti, S.R.; Kurozawa, L.E. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of grape-seed oil to enhance process yield and minimize free radical formation. *J. Sci. Food Agric*, 98, 5019–5026.
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by products in monogastric nutrition. A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 211, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>.
- Busserolles, J., Gueux, E., Balasinska, B., Piriou, Y., Edmond, R; Rayssiguier, Y; Mazur, A. (2006). In vivo antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 76: 22–27. DOI : 10.1024/0300-9831.76.1.22.
- Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V., Teissedre, P.L. (1998) Caractérisation de la matière première et des produits élaborés. Dans : *Œnologie : fondements scientifiques et technologiques*. Eds Flanzly, C., Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp 291-336.
- Cadot, Y., Miñana-Castelló, 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, pp 9206-9215.

Calder, P.C. (2011). Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol*, 668, 50–58.

Castejón, N; Luna, P; Señoráns, F.J. (2018) Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chem*, 244, 75–82.

Cetin, A., Kaynar, L., Koçyiğit, I., et al. (2008).The effect of grape seed extract on radiationinduced oxidative stress in the rat liver. *Turk J Gastroenterol*, 19(2), 92–98.

Chang, C.C et Li, R. (2019). *Agricultural waste*. 91(10), 1150-1167. doi: 10.1002/wer.1211.

Cheah, K.Y., Howarth, G.S., Bindon, K.A., Kennedy, J.A., Bastian, S.E. (2014). Low molecular weight procyanidins from grape seeds enhance the impact of 5-Fluorouracil chemotherapy on Caco-2 human colon cancer cells. *PLoS ONE*, 9, 98921.

Choi, Y., Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chem*, 11, 1386–1390.

Christ, K.L et Burrit, R.L. (2013). Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *J. Clean. Prod.* 53, 232–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.007>.

Crews, C; Hough, P; Godward, J; Brereton, P; Lees, M; Guiet, S; Winkelmann, W. (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem*, 54, 6261–6265.

Cuccia, P. (2015). Ethics+economy+environment=sustainability: Gambero Rosso on the front lines with a new concept of sustainability. *Wine Economics Policy* 4, 69–70.<http://dx.doi.org/10.1016/j.wep.2015.05.003>.

Da Porto, C; Porretto, E; Decorti, D. (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem*, 20, 1076–1080.

Dani, C., Pasquali, M.A.B., Oliveira, M.R., Umezu, FM; Salvador, M; Henriques, J.A.P; Moreira, J.C.F. (2008). Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats, *J. Med. Food* 11: 55–61.

Dimić, I., Teslić, N., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Zeković, Z., Pavlić, B. (2020). Innovative and Conventional Valorizations of Grape Seeds from Winery By-Products as Sustainable Source of Lipophilic Antioxidants. *Antioxidants*, 9, 568.

Draper, H; Hadley, M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421-431.

Duba, K.S; Fiori, L. (2015). Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: effect of process parameters on the extraction kinetics. *J Supercrit Fluids*, 98, 33–43.

Dulundu, E; Ozel, Y; Topaloglu, U; Toklu, H; Ercan, F; Gedik, N; Sener, G. (2007). Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction, *22(6)*, 885-92. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04875.x.

Elisabeth ; Jerome, J. (2014). Cultivars et soigner les fruitiers .Sang de la terre et Groupe Eryrolles.

Enginar, H., Cemek, M., Karaca, T; Perihan, U. (2007). Effect of Grape Seed Extract on Lipid Peroxidation, Antioxidant Activity and Peripheral Blood Lymphocytes in Rats Exposed to X-Radiation. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, (21), 1029–1035. DOI: 10.1002/ptr.2201.

Fakih, O., Sanver, D., Kane, D., Thorne, J.L. (2018). Exploring the biophysical properties of phytosterols in the plasma membrane for novel cancer prevention strategies. *Biochimie*, 153, 150–161.

Feng, Y., Lin, Y.M., Fratkins, J.D., LeBlanc, M.H. (2005). Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats, *Brain Res. Bull.* 66: 120–127.

Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50, 161-166.

Fernández-Iglesias, A., Quesada, H., Díaz, S., Pajuelo, D., Bladé, C., Arola, L., Salvadó, M.J; Mulero, M. (2014). Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem*, 165, 14–20.

Freedman, J.E., Parker, C III., Li L., Perlman, J.A; Frei, B; Ivanov, V; Deak, L.R; Iafrafi, M.D; Folts, J.D. (2001). Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 103(23).

Garavaglia, J., Markoski, M.M., Oliveira, A., Marcadenti, A. (2016). Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr. Metab. Insights*, 9, 59–64.

Górnaś, P., Rudzińska, M., Grygier, A., Laciś, G. (2019). Diversity of oil yield, fatty acids, tocopherols, tocotrienols, and sterols in the seeds of 19 interspecific grapes crosses. *J. Sci. Food Agric*, 99, 2078–2087.

Granados-Principal, S; Quiles, J.L, Ramirez-Tortosa, C.L; SanchezRovira, P ; Ramirez-Tortosa, M.C. (2010). New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol* 48, 1425–1438.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging* 18: 685–716.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging* 18: 685–716.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. *J. Neurochem*, 97: 1634–1658.

Hanganu, A., Todasbca, M.C., Chira, N.A., Maganu, M., Rosbca, S., 2012. The compositional characterization of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chem.* 134, 2453–2458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.048>.

Hernández-Jiménez, A., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., Kennedy, J.A. (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *J Agric Food Chem*, 57(22), 10798–10803.

Hidalgo, L. (2012). *Taille de la vigne*. Duond, Paris.

Hunt, C; Sim, J.E; Sullivan, S.J; Featherstone, T; Golden, W; Kapp-Herr, C.V; Jarret, R.A Spitz, D.R. (1998). Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 58: 3986 – 92.

Hurtado de Catalfo, G.E., Alaniz, M.J.D., Marra, C.A. (2006). Dietary lipids modify redox homeostasis and steroidogenic status in rat testis. *Nutrition*, 24, 717–726.

Hurtado de Catalfo, G.E., Alaniz, M.J.D., Marra, C.A. (2009). Influence of commercial dietary oils on lipid composition and testosterone production in interstitial cells isolated from rat testis. *Lipids*, 44, 345–357.

Hutchinson, S.A., Lianto, P., Moore, J.B., Hughes, T.A., Thorne, J.L. (2019). Phytosterols Inhibit Side-Chain Oxysterol Mediated Activation of LXR in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 3241.

Irandoost, P., Ebrahimi-Mameghani, M., Pirouzpanah, S. (2013). Does grape seed oil improve inflammation and insulin resistance in overweight or obese women, *Int. J. Food Sci. Nutr*, 64, 706–710.

Ishige, K., Schubert, D., Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 30: 433 – 46.

Ismail, A.F.M., Salem, A.A.M., Eassawy, M.M.T. (2016). Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of γ -irradiated rat. *Journal of*

Photochemistry and Photobiology B: Biology, 160, 1–
10.doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.027.

Ismail, A.F.M., Essawy, M.M.T., Salem, A.A.M. (2014). Protective effect of grape seed oil against CCl₄ induced oxidative stress in rat brain, *J. Agric. Chem. Biotechn. Mansoura Univ.* 5: 287–303.

Isnard, H. (1953). *La vigne en Algérie étude géographique.*

Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., & Sakariah, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117-122.

Jayawardena, B; Smith, R.M. (2010). Superheated water extraction of essential oils from *Cinnamomum zeylanicum* (L.). *Phytochem. Anal*, 21, 470–472.

Karaman, S; Karasu, S; Tornuk, F; Saïd Toker, O ; Geçgel , M; Sagdic , O ; Ozcan , N ; Gül, O. (2015). Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *J Agric Food Chem*, 63(8), 2305–2313.

Karbownik, M., Reiter, R.J. (2000). Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225: 9–22.

Khazri, O; Charradi, K; Limam, F; Veronique El May, M; Aouani, E. (2016). Grape seed and skin extract protects against bleomycin-induced oxidative stress in rat lung, 81 , 242-249. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.004.

Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., Tai, TC. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5(10), 3779–3827.

Kochhar, S.P.; Henry, C.J. (2009). Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. *Int. J. Food Sci. Nutr*, 60, 289–296.

Kolar, M.J., Konduri, S., Chang, T., Wang, H., McNerlin, C., Ohlsson, L., Saghatelian, A. (2019). Linoleic acid esters of hydroxy linoleic acids are anti-inflammatory lipids found in plants and mammals. *J. Biol. Chem*, 294, 10698–10707.

Krishnaswamy, K.; Orsat, V.; Gariépy, Y.; Thangavel, K. (2012). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food Bioprocess Technol*, 6, 441–455.

Lacatusu, I., Badea, N., Badea, G., Oprea, O., Mihaila, M.A., Kaya, D.A., Stan, R., Meghea, A. (2015). Lipid nanocarriers based on natural oils with high activity against oxygen free radicals and tumor cell proliferation. *Mater Sci. Eng. C*, 56, 88–94.

Lachman, J., Hejtmánková, A., Tábořský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Štřalková, R., D'edina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT Food Sci. Technol*, 63, 620–625.

Lai, X., Kang, X., Zeng, L., Li, J., Yang, Y., Liu, D. (2014). The protective effects and genetic pathways of thorn grape seeds oil against high glucose-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *BMC Complement. Altern. Med*, 14, 10.

Lavrentiadou, S.N., Tsantarliotou, M.P., Zervos, I.A., Nikolaidis, E Georgiadis, M.P; Taitzoglou, I.A. (2013). CCl₄ induces tissue-type plasminogen activator in rat brain, protective effects of oregano, rosemary or vitamin E, *Food Chem. Toxicol.* 61: 196–202.

Le Bellec, F; Renard, V. (2010). *Le grand livre des fruits tropicaux*. Orphie.

Lee, S.Y., Lee, S.J., Han, C., Patkar, A.A; Masand, P.A; Pae, C.U (2012) Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 46: 224–235.

Levadoux, L. (1951) *La sélection et l'hybridation chez la vigne*. Eds Montpellier, A.E. N.A., pp 9-195.

Levine, R.L; Garland, D ; Olivier, C.N ; Amici, A ; Lenz, A.G, Stadtman ; E.R (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464-478.

Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H.B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020–6047.

Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (Lucy). (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128(2), 391–399. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.040.

Ma, W; Nunes, I; Young, H.S.C; Spector, A. (2006). Catalase enrichment using recombinant adenovirus protects α TN4 – 1 cells from H₂O₂. *Free Radic Biol Med*, 40: 335 – 40.

Ma, Z.F; Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants*, 6, 71.

MADRP <https://agriculturemono.net/viticulture-en-algerie/>.

Maier, T., Schieder, A., Kammerer, D.R., Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem*, 112, 551–559.

Marielle,F; Jean-Claude,M.(2011).Morphologie et Anatomie de la vigne. Feret_Bordeaux.

Martin, M.E; Grao-Cruces, E; Maria C Millan-Linares, M.C; Montserrat-de la Paz, S. (2020). Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil: A Functional Food from the Winemaking Industry. 9(10), 1360. doi: 10.3390/foods9101360.

Matthäus, B. Virgin. (2008). grape seed oil: Is it really a nutritional highlight, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 110, 645–650.

Minotti, G ; Menna, P ; Salvatorelli, E ; Cairo, G ; Cianni, L. (2004). Antracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, 185–229.

Miroslava, Stankovic´., Vele, Tes´evic´., Vlatka, Vajs., Nina, Todorovic´., Slobodan Milosavljevic´., Dejan God–evac. (2008). Antioxidant Properties of Grape Seed Extract on Human Lymphocyte Oxidative Defence. *Planta Med*, 74: 730–735. DOI 10.1055/s-2008-1074521.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & Ricardo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Agricultural Food Chemistry*, 51, 6475-6481.

Morin, B., Narbonne, J.F., Ribera, D., Badouard, C. (2008). Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats, *Food Chem. Toxicol.* 46: 787–796.

Morin, O. (1996). Corn and grapeseed oil. In: Karleskind, A., Wolff, J.-P. (Eds.), *Oils and Fats Manual*. Intercept Ltd., Andover, UK, pp. 143–146.

Natella, F., Belleli, F., Gentili, V., Ursini, F., Scaccini, C (2002). Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7720–7725.

Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J., Petschen, I., Aviñó, J., Perez, P., & Estrela, J. M. (1999). Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 26: 410–418.

Navas, P.B. (2009). Chemical composition of the virgin oil obtained by mechanical pressing from several grape seed varieties (*Vitis vinifera* L.) with emphasis on minor constituents. *Arch. Latinoam. Nutr*, 59, 214–219.

Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilibert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med*, 25: 1057 – 65.

OIV <https://agriculturemono.net/viticulture-en-algerie/>.

Pierron, J.C. (2017). L'huile de pépins de raisin en France et dans le monde. OCL, DOI: 10.1051/ocl/2017034.

Postescu, I.D; Chereches, G; Tatomir, C; Daicoviciu, D; Filip, G.A. (2012). Modulation of doxorubicin-induced oxidative stress by a grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract in normal and tumor cells, 15(7), 639-45. doi: 10.1089/jmf.2011.0291.

Prasad, N., Srinivasan, M., Pugalendi, V.K., Menon, P.V. (2006). Protective effect of ferulic acid on δ -radiation-induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat Res*, 603: 129 – 34.

Puiggros, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., Salvadó, M.J. (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *J Agric Food Chem*, 53(15), 6080–6086.

Raaz, U., Toh, R., Maegdefessel, L., Adam, M; Nakagami, F; Emrich, F.C; Spin, J.M; Tsao, P.S. (2014). Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: implications for vascular diseases. *Antioxid Redox Signal*, 20(6), 914–928.

Raphael, W., Sordillo, L.M. (2013). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 21167–21188.

Ravaz, L. (1915) Les grains verts des producteurs-directs. Annales de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier, pp 200-211.

Recknagel, R.O., Glende, E.A., Dolak, J.A., Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, *Pharmacol. Ther.* 43: 139–154.

Reiter, R., Wendel, A. (1982). Chemically-induced glutathione depletion and lipid peroxidation, *Chem. Biol. Interact.* 40: 365–374.

Reynier, A. (2012). Manuel de viticulture. Lavoisier.

Rhodes, P.L., Mitchell, J.W., Wilson, M.W., Melton, L.D. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 281-286.

Rombaut, N; Savoie Thomasset, B; Castello, J; Van Hecke, E. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grapeseed cold screw pressing. *Ind Crops Prod*, 63, 26–33.

Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J., Van Hecke, É, Lanoisellé, J.L. (2014). Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 284–292. doi:10.1016/j.crci.2013.11.014

Rotava, R., Zanella, I., Silva, L.P.D., Manfron, M.P., Ceron, C.S., Alves, S.H., Karkow, A.K., Santos, J.P.A. (2009). Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by product. *Cienc. Rural*, 39, 941–944.

(2013). 500 plantes comestibles. De la chaux et Niestle, Paris.

Sangeetha, P; Balu, M; Haripriya, D; Panneerselvam, C. (2005). Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins, 40(10), 820-8. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.008.

Sano, A; Uchida, R; Saito, M; Shioya, N; Komori, Y; Thô, Y; Hashizume, N. (2007). Beneficial effects of grape seed extract on malondialdehyde-modified LDL. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 53(2), 174–182.

Schneyder, J. (1869). *De la culture de la vigne et des arbres fruitiers chez les Romains*. Dijon: Manière_Loquin, Libraire Editeur Place d'Arme.

Sehirli, O; Ozel, Y; Dulundu, E; Topaloglu, U; Ercan, F; Sener, G. (2008). Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats, 22(1), 43-8. doi: 10.1002/ptr.2256.

Shinagawa, F.B., De Santana, F.C., Torres, L.R.O., Mancini-Filho, J. (2015). Grape seed oil: A potential functional food? *Food Sci. Technol*, 35, 399–406.

Shinagawa, F.B., Santana, F.C., Mancini-Filho, J. (2015). Effect of cold pressed grape seed oil on rats biochemical markers and inflammatory profile. *Nutr*, 28, 65–76.

Shu, H; Zhang, P; Chang, C.C; Wang, R; Zhang, S. (2015). *Agricultural Waste*. 87(10), 1256-85. doi: 10.2175/106143015X14338845155660.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress, *Angew. Chem.* 25: 1058–1071.

Sies, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am. J. Med.* 91: S31–S38.

Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids*, 15, 137–149, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x>.

Signal, P.K; Li, T; Kumar, D; Danelisen, I; Iliskovic, N. (2000) .Adriamycininduced heart-failure: mechanisms modulation. *Mol Cell Biochem*, 207, 77–85.

Singleton, V.L et Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Sirinivasan, P; Vadhanam, V.M; Arif, M.J; Gupta, C.R. (2002). A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro. *Int J Oncol*, 20: 983 – 6.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res*, 579(1–2), 200–213.

Sotiropoulou, E.I., Varelas, V., Liouni M., Nerantzis E.T. (2012), Grape Seed Oil: From A Winery Waste to A Value-Added Cosmetic Product-A Review. *Edible Medicinal and NonMedicinal Plants*, 2, 867-878.

Sotiropoulou, E.I.; Varelas, V.; Liouni, M.; Nerantzis, E.T. (2020) Grape Seed Oil: From a Winery Waste to a Value Added Cosmetic Product-a Review. 2015. Available online: <https://www.researchgate.net/publication/312578959>).

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka Zimmer, M., Slomka, M., Madro, A; Celiński, K; Wielosz, M. (2003) Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication, *J. Hepato-Biliary-Pancreat. Surg*, 10: 309–315.

Tobar, P.; Moure, A.; Soto, C.; Chamy, R.; Zúñiga, M.E. (2005) Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process. *Water Sci. Technol*, 51, 47–52.

Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K., Watanabe, M. (2004). Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J Radiat Res*, 45: 181 – 8.

Usoh, F.I., Akpan, E.I., Etim, E.O., Farombi, E.O. (2005). Antioxidant actions of dried flower of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite-induced oxidative stress. *Pak, J. Nutr.* 4: 135–141.

Vander Heide, R.S; L'Ecuyer, T.J. (2007) .Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Heart Metab*, 35, 1–4.

Venkitasamy, C; Teh, H.E; Atungulu, G.G; McHugh, T.H; Pan, Z. (2014). Optimization of mechanical extraction conditions for producing grape seed oil. *Trans. ASABE*, 57, 1699–1705.

Vilahur, G., Ben-Aicha, S., Diaz, E., Badimon, L., Padro, T. (2018). Phytosterols and Inflammation. *Curr. Med. Chem*, 25, 1.

Villanueva-Bermejo, D.; Calvo, M.V.; Castro-Gómez, P.; Fornari, T.; Fontecha, J. (2019). Production of omega 3-rich oils from underutilized chia seeds. Comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. *Food Res*, 115, 400–407.

Vinson JA., Mandarano MA., Shuta DL., Bagchi M., Bagchi D. (2002). Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacinbound chromium in a hamster atherosclerosis model. *Mol Cell Biochem*, 240(1–2), 99–103.

Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci*, 11(2), 622–646.

Xue, L; Zhang, P; Shu, H; Chang, C.C; Wang, R; Zhang, S. (2016). *Agricultural Waste*, 88(10), 1334-73. doi: 10.2175/106143016X14696400495019.

Yao, J.K., Keshavan, M.S. (2011). Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view, *Antioxid. Redox Signal.* 15:2011–2035.

Zhao, L., Yagiz, Y., Xu, C., Lu, J., Chung, S., Marshall, M.R. (2015). Muscadine grape seed oil as a novel source of tocotrienols to reduce adipogenesis and adipocyte inflammation. *Food Funct.* 6, 2293–2302.

Zhou, S; Palmeira, C.M; Wallace, K.B. (2001). Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett.* 121, 151–157.

ملخص

لأشكال المختلفة لاستهلاك العنب، والتي ينتج عنها نفايات النبيذ؛ مارك العنب التي يتم إطلاقها في البيئة ويسبب العديد من المشاكل البيئية، تمثل بذور العنب جزءًا كبيرًا من المارك التي تعد مصدرًا ممتازًا لمركبات البوليفينول، ويؤدي تدمير هذه المنتجات الثانوية إلى الحصول على زيت بذور العنب (HPR) الغني بالأحماض الدهنية والمركبات الفينولية والفيتامينات ويعرض العديد من الأنشطة البيولوجية. تهدف دراستنا إلى تقييم قدرة مضادات الأكسدة في المختبر لزيت بذور العنب واختبارها على الخلايا الليمفاوية البشرية التي سبق تأكسدها بواسطة H_2O_2 وذلك بقياس علامة العدوان الخلوي (LDH) و بقياس علامات الأكسدة (MDA) و (PCAR) وكذلك بقياس مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة (GSH) و (CAT)، نتأجنا أظهرت ان زيت بذور العنب تسمح بنقصان كمية علامات الأكسدة وزيادة مستوى الانزيمات المضادة للأكسدة عند تراكيز معينة.

الكلمات المفتاحية: زيت بذور العنب، نفايات النبيذ، نشاط مضادات الأكسدة، الخلايا اللمفاوية

Résumé

Les différentes formes de consommation du raisin dont la vinification engendrent des déchets vinicoles ; le marc de raisin qui est rejeté dans l'environnement et provoque plusieurs problèmes écologiques les pépins de raisin représentent une portion importante du marc qui sont une excellente source de composés polyphénoliques, la valorisation de ces sous-produits conduit à l'obtention de l'huile des pépins de raisin (HPR) qui est riche en acides gras, composés phénoliques et en vitamines et présente plusieurs activités biologiques. Notre étude a pour but d'évaluer la capacité antioxydante in vitro de l'HPR testé sur les lymphocytes humains préalablement oxydés par le H_2O_2 en mesurant le taux des marqueurs d'agression cellulaires (LDH), les marqueurs de l'oxydation (MDA, PCAR) ainsi que les marqueurs antioxydants et le taux des enzymes antioxydants endogènes (GSH, CAT). Nos résultats montrent que l'HPR augmente le taux du GSH et CAT et diminue le taux du LDH, MDA et PCAR à des concentrations bien déterminées.

Mots clés: Déchets vinicoles, HPR, activité antioxydante, lymphocytes.

Abstract

The different forms of grape consumption, the vinification of which generates wine waste; the grape marc which is released into the environment and causes several ecological problems the grape seeds represent a significant portion of the marc which are an excellent source of polyphenolic compounds, the valorization of these by-products leads to obtaining the Grapeseed Oil (HPR) which is rich in fatty acids, phenolic compounds and vitamins and exhibits several biological activities. Our study aims to evaluate the antioxidant capacity in vitro of the HPR tested on human lymphocytes previously oxidized by H_2O_2 by measuring the level of cellular aggression markers (LDH), oxidation markers (MDA, PCAR) as well as antioxidant markers and the level of endogenous antioxidant enzymes (GSH, CAT). Our results show that HPR increases the level of GSH and CAT and decreases the level of LDH, MDA and PCAR at well-defined concentrations.

Keywords: Wine waste, HPR, antioxidant activity, lymphocyte