



**HAL**  
open science

# L'ε-viniférine, un dimère du resvératrol : encapsulation, métabolisme et propriétés biologiques

Pauline Beaumont

## ► To cite this version:

Pauline Beaumont. L'ε-viniférine, un dimère du resvératrol : encapsulation, métabolisme et propriétés biologiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0358 . tel-03499885

**HAL Id: tel-03499885**

**<https://theses.hal.science/tel-03499885v1>**

Submitted on 21 Dec 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NUTRITION

Par Pauline BEAUMONT

L' $\epsilon$ -viniférine, un dimère du resvératrol : encapsulation,  
métabolisme et propriétés biologiques

Sous la direction du Dr. Stéphanie KRISA

Soutenue le 14 Décembre 2021

Membres du jury :

M. DE FREITAS Victor	Professeur, Université de Porto, Portugal	Rapporteur
M. DELMAS Dominique	Professeur, Université de Bourgogne, France	Rapporteur
Mme. PORTILLO Maria Puy	Professeur, Université du Pays Basque, Espagne	Examinatrice
M. DANGLES Olivier	Professeur, Université d'Avignon, France	Examineur
Mme. FAURE Chrystel	Professeur, Université de Bordeaux, France	Invitée
M. COURTOIS Arnaud	Maître de Conférences, Université de Bordeaux, France	Invité



## **L' $\epsilon$ -viniférine, un dimère du resvératrol : encapsulation, métabolisme et propriétés biologiques**

L' $\epsilon$ -viniférine est un polyphénol appartenant à la famille des stilbènes. Ce dimère du resvératrol, notamment retrouvé dans les sarments de vigne, est présent dans l'alimentation humaine principalement *via* la consommation de raisin et de ses produits dérivés comme le vin rouge. Bien que cette molécule ait montré d'intéressantes propriétés biologiques ; et en particulier des activités anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-obésité et neuro-protectrices, il a été démontré qu'elle était très peu biodisponible. En effet, comme de nombreux stilbènes, l' $\epsilon$ -viniférine, en plus d'être faiblement absorbée à travers la barrière intestinale, subit un fort métabolisme. De ce fait, les études actuelles visent à déterminer l'implication des métabolites dans ses propriétés biologiques observées *in vivo*. Ces travaux de thèse avaient pour objectifs de déterminer l'impact d'une encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur son métabolisme et ses paramètres pharmacocinétiques chez le rat, ainsi que d'évaluer les potentielles propriétés biologiques de ses principaux métabolites *in vitro*. Dans un premier temps, le procédé de fabrication des liposomes multilamellaires contenant l' $\epsilon$ -viniférine a été optimisé, dans le but d'augmenter le taux d'encapsulation de la molécule, et de produire ces objets en quantité suffisante pour réaliser une expérimentation *in vivo*. La forme libre et la forme encapsulée de l' $\epsilon$ -viniférine ont été administrées par voie orale chez le rat, les plasmas ont été récoltés à différents temps, ainsi que différents tissus 4 heures après administration. Les résultats indiquent une forte glucuronidation, issue du métabolisme hépatique et intestinal, ainsi qu'une accumulation des métabolites et de la forme native dans les tissus adipeux blancs. L'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine semble prolonger le temps d'exposition de l'organisme aux glucuronides. Dans un second temps, la purification de ces glucuronides a également permis d'apprécier leurs propriétés biologiques sur des modèles cellulaires de macrophages et d'hépatocytes, mettant en évidence des propriétés anti-inflammatoires et une capacité à diminuer l'accumulation des lipides. Ces travaux montrent que l' $\epsilon$ -viniférine, un stilbène de la vigne, pourrait présenter des effets bénéfiques sur la santé, par elle-même ou l'intermédiaire de ses métabolites.

**Mots clés :  $\epsilon$ -viniférine, dimère du resvératrol, encapsulation, pharmacocinétique, métabolisme, glucuronidation, propriétés biologiques**

## **$\epsilon$ -Viniferin, a resveratrol dimer : encapsulation, metabolism and biological properties**

$\epsilon$ -Viniferin is a polyphenol belonging to the stilbene family. This dimer of resveratrol, found in particular in vine shoots, is present in the human diet mainly through the consumption of grapes and its derivatives such as red wine. Although this molecule has shown interesting biological properties, and especially anti-inflammatory, antioxidant, anti-obesity and neuroprotective activities, it has been shown to have very low bioavailability. Indeed, like many stilbenes,  $\epsilon$ -viniferin, in addition to being poorly absorbed through the intestinal barrier, undergoes a strong metabolism. Therefore, the current studies aim to determine the involvement of metabolites in the biological properties observed *in vivo*. The objectives of this thesis were to determine the impact of  $\epsilon$ -viniferin encapsulation on its metabolism and pharmacokinetic parameters in rats, as well as to evaluate the potential biological properties of its main metabolites *in vitro*. In a first step, the manufacturing process of multilamellar liposomes containing  $\epsilon$ -viniferin was optimised, with the aim of increasing the encapsulation rate of the molecule, and to produce these objects in sufficient quantity to carry out *in vivo* experimentation. The free and encapsulated forms of  $\epsilon$ -viniferin were administered orally to rats, the plasmas were collected at different times, as well as different tissues 4 hours after administration. The results indicate high glucuronidation, from hepatic and intestinal metabolism, as well as accumulation of the metabolites and the native form in white adipose tissue. The encapsulation of  $\epsilon$ -viniferin seems to prolong the exposure time of the body to glucuronides. In a second step, the purification of these glucuronides also allowed us to assess their biological properties on macrophage and hepatocyte cell models, revealing anti-inflammatory properties and an ability to decrease lipid accumulation. This work shows that  $\epsilon$ -viniferin, a grapevine stilbene, could have beneficial effects on health, by itself or through its metabolites.

**Keywords:  $\epsilon$ -viniferin, resveratrol dimer, encapsulation, pharmacokinetic, metabolism, glucuronidation, biological properties**

# *Remerciements*

## *Aux membres du jury*

Mes remerciements s'adressent dans un premier temps aux membres du jury : Pr. Olivier Dangles de l'Université d'Avignon, Pr. Victor de Freitas de l'Université de Porto, Pr. Dominique Delmas de l'Université de Bourgogne. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'évaluer cette thèse, fruit de trois années de travail.

## *A Stéphanie Krisa et Arnaud Courtois*

Je remercie chaleureusement Stéphanie Krisa, ma directrice de thèse, et Arnaud Courtois, mon co-encadrant pour leur soutien et leur confiance. Je suis pleinement consciente de la chance que j'ai eue de vous avoir à mes côtés durant cette thèse. Stéphanie, merci mille fois pour ces trois années, où vous avez su me pousser vers l'autonomie avec bienveillance et me soutenir quand la confiance manquait. J'ai beaucoup appris à vos côtés, sur le plan scientifique comme humain et vous en remercie. Merci également pour votre soutien dans les moments difficiles.

## *Aux membres de la Team Molécules d'Intérêt Biologique (MIB)*

Je remercie ensuite le Pr. Tristan Richard de m'avoir accueilli au sein de l'Axe MIB et d'avoir soutenu ce travail avec un regard bienveillant. Intégrer cette équipe fut un réel plaisir. Aussi, je tiens à remercier l'ensemble des membres du MIB pour leur aide, leur soutien, et tous les moments conviviaux que nous avons partagés. Une attention toute particulière à Josep Valls et Elodie Renouf pour leur aide au laboratoire, à Antonio Palos-Pinto pour son aide précieuse dans la production de l' $\epsilon$ -viniférine, à Eric Pedrot pour son aide et sa bonne humeur, à Caroline Rouger avec qui j'ai eu le plaisir de partager un projet et à Monsieur Jean-Michel Mérillon pour m'avoir conseillée et aidée dans mes choix d'orientation. Merci également à tous les autres membres de cette équipe qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux : Pierre Waffo-Téguo, Alain Decendit, Alain Badoc, Grégory Da Costa, Marie-Laure Iglesias, Stéphanie Cluzet, Karen Gaudin.

Enfin, merci aux doctorants, post-doctorants et ATER pour le soutien et les moments de rire et de décompression : Toni, Charles, Inès, Julie, Aghiles, Aleksandra, Eva, Omar, Benjamin, David, Biranty et Anthony.

### *Aux collaborations*

J'ai eu la chance durant cette thèse de réaliser des missions de monitorat au sein de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, et notamment avec Marina Bely. Je la remercie chaleureusement de m'avoir initié à la pédagogie, et pour son soutien sans faille.

Ce travail de thèse est le fruit de plusieurs collaborations. Je remercie Axel Marchal et Marie Le Scanff de l'axe Déterminants des Propriétés Sensorielles (DPS) pour leur aide et le temps qu'ils ont accordé à mes travaux. Un grand merci à Michael Jourdes, de l'axe DPS, pour son aide indispensable dans les expériences d'hémisynthèse et ses conseils précieux. Je remercie également Claude Atgié et Chrystel Faure du centre de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN) de Pessac pour leur aide et les discussions constructives. Un grand merci à Chrystel pour le temps qu'elle a consacré à ces travaux et la bienveillance dont elle a fait preuve à mon égard. Merci également à Samuel Amintas, du Laboratoire de Biologie des tumeurs et Tumorothèque de m'avoir fait confiance sur l'un de ses projets.

Je remercie Maria Puy Portillo de m'avoir accueilli durant trois mois dans son équipe à l'Université du Pays Basque (Vitoria, Espagne). Cette expérience fut très enrichissante et je mesure la chance que j'ai eue de pouvoir réaliser une mobilité internationale en temps de pandémie. Merci à Itziar Eseberri, qui m'a encadrée durant cette mobilité. Travailler avec elle fut très formateur sur le plan personnel et professionnel. Eskerrik asko !

### *A mes proches*

A Sophie Lafay, enseignante devenue amie, merci pour tout. Merci à mes amis sans qui ces trois années n'auraient pas été pareilles. Merci à Thomas, à mon frère Guillaume et ma belle-sœur Fanny (votre soutien a été très important pour moi), à ma cousine Elisa dont je suis très fière, et bien évidemment à mes parents.

# Table des matières

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>INDEX DES FIGURES</b> .....	<b>10</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>2</b>
<b>ÉTAT DE L'ART</b> .....	<b>2</b>
CHAPITRE 1. LES STILBÈNES : DE LA MOLECULE A LA NUTRITION-SANTE .....	5
1. <i>Présentation générale des composés phénoliques</i> .....	5
1.1 Biosynthèse et classification des composés phénoliques .....	5
1.2 Consommation des composés phénoliques .....	9
2. <i>Les stilbènes</i> .....	10
2.1 Les stilbènes : des monomères aux oligomères.....	10
2.2 Distribution des stilbènes dans le règne végétal .....	11
2.3 Les stilbènes dans l'alimentation.....	12
3. <i>Intérêts de la vigne pour la nutrition-santé</i> .....	14
3.1 Vitis vinifera dans le domaine des compléments alimentaires.....	14
3.2 Les études d'efficacité des extraits de raisin et de vigne .....	15
CHAPITRE 2. BIODISPONIBILITE, ABSORPTION ET METABOLISME DES STILBÈNES.....	16
1. <i>Généralités sur le système digestif</i> .....	16
1.1 Les différentes composantes impliquées dans le processus de digestion .....	16
1.2 L'intestin, site d'absorption et de biotransformations .....	19
1.3 Le métabolisme intestinal et hépatique des xénobiotiques .....	20
1.4 Le microbiote intestinal .....	21
2. <i>Absorption et métabolisme des stilbènes</i> .....	22
2.1 Absorption et métabolisme intestinaux des stilbènes.....	22
2.2 Métabolisme hépatique des stilbènes .....	25
2.3 Les interactions avec le microbiote intestinal.....	26
2.4 Transport et distribution des stilbènes .....	27
3. <i>Pharmacocinétique et biodistribution des stilbènes</i> .....	27
3.1 Généralités sur la pharmacocinétique .....	27
3.2 Etudes pré-cliniques de pharmacocinétique des stilbènes.....	28
4. <i>L'ε-viniférine et son métabolisme</i> .....	30
4.1 Les études in vitro sur l'absorption et le métabolisme .....	30
4.2 Les études pharmacocinétiques de l'ε-viniférine chez l'animal .....	32
CHAPITRE 3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'ε-VINIFERINE.....	34
1. <i>Revue scientifique sur les propriétés biologiques de l'ε-viniférine</i> .....	34
2. <i>La stéatose hépatique non-alcoolique</i> .....	71
2.1 Présentation générale des NAFLD .....	71
2.2 Mécanismes impliqués dans les NAFLD .....	71
2.3 Intérêt des stilbènes .....	75
CHAPITRE 4. ENCAPSULATION DES STILBÈNES .....	77
1. <i>Différents systèmes d'encapsulation</i> .....	77
1.1 Différentes techniques d'encapsulation .....	78
1.2 L'encapsulation dans des liposomes.....	79
2. <i>Préparation et caractérisation des liposomes</i> .....	81
2.1 Protocoles de formation des liposomes .....	81
2.2 Caractérisations physico-chimiques des liposomes .....	84
2.3 Les liposomes multilamellaires de type oignon .....	85
3. <i>L'encapsulation des stilbènes</i> .....	89
3.1 Intérêts de l'encapsulation montrés à l'aide d'expérimentations in vitro .....	89
3.2 Intérêts de l'encapsulation montrés à l'aide d'expérimentations in vivo .....	90
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>94</b>



<b>VOLUME I    ENCAPSULATION DE L'É-VINIFÉRIQUE DANS LES LIPOSOMES MULTILAMELLAIRES .....</b>	<b>98</b>
INTRODUCTION.....	99
OBJECTIFS .....	99
1. <i>Amélioration de la fabrication des MLLs et mesure du taux d'encapsulation de l'é-viniférine</i> .....	100
1.1 Protocole de fabrication et de caractérisation des MLLs.....	100
1.2 Amélioration de la fabrication des MLLs.....	102
1.3 Séparation de l'é-viniférine non-encapsulée par les méthodes conventionnelles .....	103
1.4 Développement de la méthode de séparation de l'é-viniférine non-encapsulée.....	104
1.5 Conclusions sur la méthode de séparation par filtration.....	120
2. <i>Mesure de la stabilité des MLLs dans différentes matrices</i> .....	121
2.1 Stabilité des MLLs suspendus en solution aqueuse .....	121
2.2 Stabilité des MLLs dans un milieu réactionnel.....	121
2.3 Impact de l'encapsulation de l'é-viniférine sur son métabolisme in vitro .....	122
CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU VOLUME I.....	125
<b>VOLUME II    QUANTIFICATION DE L'É-VINIFÉRIQUE ET SES MÉTABOLITES GLUCURONIDES DANS LE PLASMA ET LES TISSUS DE RAT APRÈS ADMINISTRATION ORALE DE LA MOLECULE LIBRE ET ENCAPSULÉE.....</b>	<b>126</b>
INTRODUCTION.....	127
OBJECTIFS .....	127
1. <i>Optimisation de la production des métabolites glucuronidés par hémisynthèse</i> .....	128
1.1 Stratégie, matériel et méthodes .....	128
1.2 Résultats et discussion de l'optimisation de la production des glucuronides par hémisynthèse .....	131
2. <i>Effet de l'encapsulation de l'é-viniférine sur ses paramètres pharmacocinétiques et sa distribution tissulaire chez le rat</i> .....	135
2.1 Validation de la méthode d'extraction et de quantification sur plasma.....	135
2.2 Impact de l'encapsulation de l'é-viniférine sur ses paramètres pharmacocinétiques .....	137
2.3 Discussions sur la pharmacocinétique et la distribution tissulaire de l'é-viniférine encapsulée et non encapsulée chez le rat .....	155
CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU VOLUME II.....	157
<b>VOLUME III    PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES MÉTABOLITES GLUCURONIDES DE L'É-VINIFÉRIQUE SUR LIGNES CELLULAIRES D'HEPATOCYTES ET DE MACROPHAGES .....</b>	<b>158</b>
INTRODUCTION.....	159
OBJECTIFS .....	159
1. <i>Activités des glucuronides de l'é-viniférine sur l'accumulation de triglycérides dans des hépatocytes en culture induits en stéatose</i> .....	160
1.1 Stratégie, matériel et méthode des expériences sur hépatocytes .....	160
1.2 Résultats et discussion des expériences sur hépatocytes.....	161
1.3 Conclusions sur l'activité des molécules dans un modèle de stéatose hépatique in vitro.....	174
2. <i>Activités anti-inflammatoires des glucuronides de l'é-viniférine sur macrophages</i> .....	175
2.1 Stratégie, matériel et méthode des expériences sur macrophages.....	175
2.2 Effets anti-inflammatoires de l'é-viniférine et ses glucuronides sur des macrophages en culture.....	177
2.3 Discussions sur les propriétés anti-inflammatoires des composés.....	180
CONCLUSIONS GÉNÉRALES DU VOLUME III.....	182
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>183</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>186</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>188</b>

## *Abréviations*

ABC	ATP Binding Cassette	TD	Tube Digestif
ACC	Acétyl-CoA Carboxylase	T <sub>max</sub>	Temps Maximal
ALT	Alanine amino Transférase	TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
AML12	Alpha Mouse Liver 12	UCP	Uncoupling Protein
AMPK	Adénosine Monophosphate Protéine Kinase	UDP	Uridine 5'-diphosphate
ApoB100	Apolipoprotein B 100	UDPGA	Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid
ARNm	Acide Ribonucléique messenger	UGT	UDP-glucuronosyl transferase
ATGL	Adipose Tissue Triglyceride Lipase	UPLC	Ultra High-Performance Liquid Chromatography
ATP	Adénosine Triphosphate	Vd	Volume de Distribution
AUC	Area Under Curve	VIS	Visible
CD36	Cluster Differentiation 36	VLDL	Very Light Density Lipoprotein
C <sub>max</sub>	Concentration maximale	WB	Western Blot
CPT1a	Carnitine Palmitoyl Transferase 1a		
CYP 450	Cytochrome P 450		
DAD	Diode Array Detector		
DAG	Diacylglycérol		
DAGT	Diacylglycérol O-acyltransférase		
FABP	Fatty Acid Binding Protein		
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide		
FAS	Fatty Acid Synthase		
FAT	Fatty Acid Translocase		
FATP	Fatty Acid Transporter Protein		
GLUT	Glucose Transporter		
HESI	Heated Electrospray Ionization		
IP	Intrapéritonéal		
IV	Intraveineux		
LOQ	Limit of Quantification		
LPS	Lipopolysaccharides		
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1		
MGL	Monoglyceride Lipase		
MLLs	Multilamellar Liposomes		
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein		
MRT	Mean Residence Time		
MS	Mass Spectrometry		
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease		
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis		
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide		
PA	Palmitic Acid		
PAPS	3'-Phosphoadénosine 5'-phosphosulfate		
PC	Poids Corporel		
Pgp	P-glycoprotéine		
PLGA	poly(lactide-co-glycolide)		
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma		
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction		
RSD	Relative Standard Deviation		
SGLT	Sodium-Glucose Transporter		
SULT	Sulfo-Transférase		

## *Index des figures*

Figure 1. Principales voies de biosynthèses des composés phénoliques depuis la phénylalanine issue de la voie du shikimate.....	6
Figure 2. Structures de base des différents flavonoïdes .....	8
Figure 3. Structure des deux formes isomériques du resvératrol .....	9
Figure 4. Stilbène et stilbénoides .....	10
Figure 5. Mécanismes hypothétiques de la dimérisation pour former l'ε-viniférine .....	11
Figure 6. Schéma général du système digestif .....	17
Figure 7. Organisation générale du tube digestif .....	19
Figure 8. Différenciation de la lignée cellulaire Caco-2 .....	23
Figure 9. Mécanismes impliqués dans l'absorption et le métabolisme du resvératrol et du picéide dans les entérocytes. ....	24
Figure 10. Glucuronidation en 3 (R3G) et 4' (R4'G) du resvératrol à 100 ou 1000 μM sur microsomes de différentes espèces.....	26
Figure 11. Structure des 4 métabolites glucuronidés et des 4 métabolites sulfatés de l'ε-viniférine ....	31
Figure 12. Réactions de glucuronidation et de sulfatation de l'ε-viniférine.....	32
Figure 13. Évolution dans le temps des concentrations plasmatiques et tissulaires de l'ε-viniférine et ses métabolites glucurono- et sulfo-conjugués après administration intra-péritonéale de 50 mg/kg pc d'ε-viniférine chez le rat. ....	33
Figure 14. Vue d'ensemble des propriétés biologiques de l'ε-viniférine.....	34
Figure 15. Mécanismes principaux de la β-oxydation mitochondriale .....	73
Figure 16. Principaux mécanismes impliqués dans l'accumulation des triglycérides dans les cellules du foie.....	74
Figure 17. Encapsulation des molécules dans les liposomes .....	79
Figure 18. Représentation schématique des différents types de liposomes [194].....	80
Figure 19. Principales étapes de fabrication des liposomes multilamellaires de type oignons pour encapsuler une molécule hydrophobe .....	86
Figure 20. Observation des sphérulites en microscopie à lumière polarisée et Cryo-TEM.....	87
Figure 21. Organisation générale de la thèse .....	95
Figure 22. Représentation des MLLs avant et après suspension dans l'eau.....	101
Figure 23. Image de microscopie en lumière polarisée d'une production de MLLs fabriqués à partir de 4% d'ε-viniférine.....	102
Figure 24. Différents protocoles de mesure du taux d'encapsulation d'une suspension de MLLs contenant l'ε-viniférine encapsulée et non-encapsulée. ....	103

Figure 25. Stabilité des MLLs dans l'eau et le milieu réactionnel.....	121
Figure 26. Chromatogramme UPLC-DAD à 320 nm d'une réaction de glucuronidation <i>in vitro</i> avec des fractions hépatiques de rat.....	123
Figure 27. Dosage de l' $\epsilon$ -viniférine et total des $\epsilon$ -viniférine-glucuronides après expositions à des fractions hépatiques.....	123
Figure 28. Étapes de la réaction de glucuronidation de l' $\epsilon$ -viniférine par hémisynthèse.....	128
Figure 29. Structure des différents isomères de l' $\epsilon$ -viniférine glucuronidée.....	129
Figure 30. Design du plan factoriel à deux facteurs, utilisé pour optimiser la réaction d'hémisynthèse. ....	130
Figure 31. Réaction de glucuronidation par hémisynthèse (% des aires à 320 nm du total des glucuronides / aire de l' $\epsilon$ -viniférine) de trois expériences (potassium à température ambiante, potassium à 50°C, césium à 50°C).....	132
Figure 32. Surface de réponse du ratio des glucuronides totaux produits par hémisynthèse (AUC à 320 nm du total des 4 glucuronides) .....	133
Figure 33. Chromatogramme à 320 nm de la production passée en HPLC-semi-préparative (A), et chromatogramme des pics récoltés en UPLC-DAD à 320 nm (B). ....	134
Figure 34. Structure de VG1 .....	135
Figure 35. Courbes de calibration de l' $\epsilon$ -viniférine et VG1 dans le plasma blanc de rat.....	137
Figure 36. Images en microscope optique (objectif x40) des cellules AML12 (A) avant confluence, (B) à confluence et (C) après induction de l'état stéatosique par exposition au PA.....	161
Figure 37. Viabilité cellulaire des macrophages après expositions à différentes concentrations de resvératrol, $\epsilon$ -viniférine, VG1, VG2, VG3 et VG4. ....	177
Figure 38. Production de NO dans les macrophages après induction aux LPS et exposition à différentes concentrations de VG1, VG2, VG3, VG4, resvératrol et $\epsilon$ -viniférine. ....	178
Figure 39. Dosage des milieux de culture des macrophages après exposition à différentes concentrations de VG1, avec ou sans stimulation de l'inflammation par les LPS. ....	179

## *Index des tableaux*

Tableau 1. Fonctionnalisation du resvératrol et principaux monomères formés.....	10
Tableau 2. Teneur en différents stilbènes dans les baies, les vins rouges et les vins blancs. ....	13
Tableau 3. Études de la consommation journalière de stilbènes chez l'Homme .....	13
Tableau 4. Paramètres pharmacocinétiques des stilbènes après administration orale chez le rat. ....	28
Tableau 5. Encapsulation du resvératrol et études in vivo .....	92
Tableau 6. Conditions des expériences réalisées pour le plan expérimental.....	130

## *Introduction générale*

Les stilbènes sont des polyphénols dont la molécule de base est le resvératrol. Ils sont retrouvés dans le règne végétal, notamment chez les *Vitaceae*. Ces composés sont présents dans les bois de vigne et également dans les raisins. Par conséquent, les vins peuvent contenir des stilbènes et ces boissons représentent la principale source de ces composés dans l'alimentation occidentale. Au sein de cette classe de composés se trouve l' $\epsilon$ -viniférine, un dimère du resvératrol. Cette molécule est retrouvée principalement dans les bois de vigne (*Vitis vinifera*), avec des concentrations parfois supérieures à celles du resvératrol, ainsi que dans les fruits.

L' $\epsilon$ -viniférine, comme de nombreux autres polyphénols, a fait l'objet de plusieurs études visant à déterminer ses propriétés biologiques. Au-delà de ses activités antioxydantes communes avec de nombreux polyphénols, elle a montré des propriétés anti-inflammatoires, anti-neurodégénératives, ainsi que des propriétés contre l'obésité et ses complications associées telles que la stéatose hépatique. Parmi ces études, certaines ont été réalisées *in vivo* chez l'animal, après administration par voie orale de la molécule, ce qui amène à s'interroger sur le devenir de la molécule dans l'organisme.

Des études ont démontré que cette molécule était peu biodisponible, du fait de sa faible absorption intestinale et de son fort métabolisme. Les stilbènes, comme de nombreux composés ingérés, peuvent subir différentes transformations, notamment au niveau de l'intestin et du foie, ce qui diminue donc le pourcentage de la molécule native retrouvée dans l'organisme. Pour pallier à la faible biodisponibilité des stilbènes, et des polyphénols en général, de nombreuses recherches tendent à développer et à évaluer l'efficacité des nano-formulations. En effet, il a été montré que l'encapsulation de molécules peu biodisponibles peut améliorer les paramètres pharmacocinétiques de celles-ci.

Concernant le métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine, il implique principalement des réactions du métabolisme de phase II, et notamment la glucurono-conjugaison. Une précédente étude réalisée au sein du laboratoire a mis en évidence un fort métabolisme hépatique, et également une accumulation tissulaire de la molécule, notamment dans les tissus adipeux blancs. Par ailleurs, aucune étude visant à quantifier spécifiquement ces métabolites après administration orale de l' $\epsilon$ -viniférine n'a été menée jusqu'à ce jour. Les métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine n'étant pas commercialisés, leur quantification spécifique reste difficile.

Des réactions d'hémisynthèse permettent de former ces métabolites glucuronidés à partir de l' $\epsilon$ -viniférine. Couplée aux techniques de séparations telles que les chromatographies liquides, il est donc possible de purifier ces composés. L'obtention de ces molécules pures permet alors d'envisager des études *in vitro* visant à mesurer leurs activités. En effet, l'hypothèse selon laquelle les métabolites des formes natives sont responsables ou impliquées dans les activités biologiques mesurées *in vivo*, a été confirmée sur d'autres polyphénols comme le resvératrol ou la quercétine. Cela suggère que les propriétés biologiques de l' $\epsilon$ -viniférine mesurées *in vivo* pourraient être dues aux métabolites de celle-ci.

Cette thèse a été menée dans le but de répondre à plusieurs questions concernant l'impact de l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur sa pharmacocinétique, le métabolisme de cette molécule après administration orale et les propriétés biologiques de ses métabolites glucuronidés.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Axe Molécules d'Intérêt Biologique (MIB), qui fait partie de l'Unité de Recherche Œnologie de l'Université de Bordeaux, et situé à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin. Plusieurs collaborations avec d'autres axes de l'unité ont permis de mener à bien ce projet, et notamment avec l'axe DPS. Une collaboration étroite avec le centre de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN, Pessac, France) a pris une part importante dans ces travaux, notamment concernant l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine. Enfin, une mobilité internationale de trois mois a permis d'enrichir une collaboration préexistante avec le groupe Nutrition et Obésité de la Faculté de Pharmacie de l'Université du Pays Basque (Vitoria-Gasteiz, Espagne) et de mener à bien des études *in vitro* sur des lignées cellulaires.

L'introduction de ce manuscrit est un état de l'art permettant de mieux cerner le contexte de cette thèse. Elle est divisée en quatre chapitres. Viendront ensuite trois volumes, rédigés sur articles, consacrés aux travaux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine, à son étude pharmacocinétique *in vivo* et aux propriétés biologiques des métabolites glucuronidés de ce stilbène.



*État de l'art*

## **Chapitre 1. Les stilbènes : de la molécule à la nutrition-santé**

Ce chapitre vise à décrire la place des stilbènes au sein du grand groupe des métabolites secondaires. A l'origine, les métabolites secondaires sont nommés comme tels car ce sont des molécules produites par les végétaux qui ne semblaient pas avoir d'implication directe dans le développement et la reproduction de la plante. Il est aujourd'hui admis que ces molécules sont nécessaires pour l'adaptation des plantes à leur environnement [1]. Les métabolites secondaires (également appelés métabolites spécialisés) sont divisés en trois grandes familles :

- les terpènes ; qui sont des composés formés d'un nombre variable d'unités isoprène, certains odoriférants permettent d'attirer des insectes pour favoriser la pollinisation notamment ;
- les alcaloïdes, sont des molécules azotées possédant des activités pharmacologiques marquées ; et ils sont impliqués dans les défenses de la plante ;
- les composés phénoliques, qui participent aussi aux mécanismes de défense des plantes notamment grâce à leurs propriétés antimicrobiennes.

C'est dans cette dernière famille et plus particulièrement dans le groupe des stilbènes que se trouve l' $\epsilon$ -viniférine, la molécule étudiée dans ces travaux de thèse. Les composés phénoliques représentent une famille de plusieurs dizaines de milliers de métabolites secondaires, classés selon leur structure chimique. Dans ce chapitre, nous présenterons brièvement ces composés, pour ensuite se focaliser sur les stilbènes, en décrivant leur biosynthèse, leur distribution et leur place dans l'alimentation.

### **1. Présentation générale des composés phénoliques**

#### **1.1 Biosynthèse et classification des composés phénoliques**

##### 1.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont issus de la voie du shikimate (ou voie de l'acide shikimique), commune à d'autres organismes tels que les bactéries et mycètes, et qui permet la synthèse d'acides aminés aromatiques comme la phénylalanine [2]. C'est cette phénylalanine qui va, par la voie des phénylpropanoïdes, permettre la biosynthèse des composés phénoliques (Figure 1) [3]. En effet, la phénylalanine va subir une désamination et devenir du cinnamate sous l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Viendra ensuite une hydroxylation, catalysée par la cinnamate-4-hydroxylase (C4H), qui donnera du 4-hydroxycinnamate. Par ailleurs, chez certaines plantes, le 4-hydroxycinnamate peut être produit de façon directe depuis la tyrosine sous l'action de d'une tyrosine ammoniac lyase.

Les acides phénoliques sont issus de réactions enzymatiques ayant comme molécule de départ le cinnamate ou le 4-hydroxycinnamate. Le cinnamate, aussi appelé acide *p*-coumarique, donnera des dérivés de l'acide cinnamique sous l'action d'enzymes telles que la *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H) ou encore la caféique/5-hydroxyférulique-O-méthyltransférase (COMT). Le 4-hydroxycinnamate (*p*-coumaroyl-CoA) donnera des dérivés de l'acide benzoïque sous

l'action d'enzymes telles que l'énol-CoA hydratase (ECH), l'alcool déshydrogénase (ADH), l'acylCoA thiolase (AT) et la thiol estérase (TE) [4–6].

Le 4-hydroxycinnamate peut également se condenser avec une co-enzyme A sous l'action de l'enzyme 4-coumaroyl CoA-ligase (4CL) et formera alors le 4-coumaroyl CoA. Cette molécule est la pierre angulaire de deux voies de biosynthèse. En effet, en se condensant avec trois unités malonyl-CoA, le 4-coumaroyl CoA va former de la naringénine chalcone sous l'action de la chalcone synthase (CHS) et donnera ensuite la molécule de base des flavanones sous l'action de la chalcone isomérase (CHI). Sous l'action de la stilbène synthase (STS), cette condensation donnera du resvératrol, molécule de base des stilbènes.

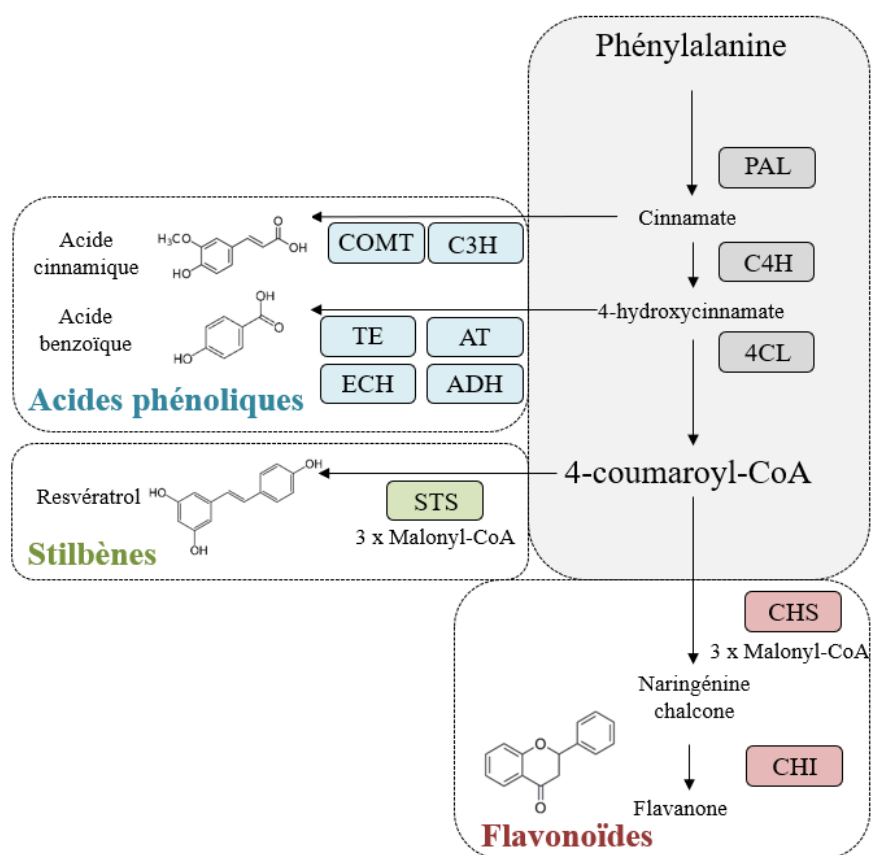


Figure 1. Principales voies de biosynthèses des composés phénoliques depuis la phénylalanine issue de la voie du shikimate.

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumaroyl CoA-ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone isomérase ; STS : stilbène synthase ; COMT : caféique/5-hydroxyfêrulique-O-méthyltransférase ; C3H : p-coumarate 3-hydroxylase ; TE : thiol estérase ; AT : acylCoA thiolase ; ECH : ényl-CoA hydratase ; ADH : alcool déshydrogénase.

### 1.1.2 Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont tous une caractéristique commune, à savoir la présence d'au moins un groupement phénol, c'est-à-dire un noyau benzénique avec au minimum un

groupement hydroxyle. Ces composés phénoliques sont divisés en deux grandes catégories : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

### *Les flavonoïdes*

Cette famille est constituée de sous-groupes, représentés en Figure 2, qui ont comme lien commun la structure de base en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, c'est-à-dire deux cycles benzéniques reliés entre eux par un hétérocycle. Parmi les différents flavonoïdes, on retrouve :

-**les flavanones**, qui contiennent une fonction cétone sur l'hétérocycle. On retrouve dans cette famille la naringénine, par exemple dans le pamplemousse ;

-**les flavanols**, qui sont majoritairement des flavan-3-ols, et se reconnaissent facilement par leur unité benzopyrane. La molécule la plus connue est la catéchine. En se polymérisant, les flavanols vont former des proanthocyanidines, aussi appelés tanins condensés ou tanins catéchiques. Ces molécules oligomériques sont présentes notamment dans les prunes, les fraises et les cassis [7]. En œnologie, elles sont connues pour avoir des interactions de type liaison hydrogène notamment avec les protéines salivaires riches en proline : ces interactions font précipiter le complexe moléculaire ainsi formé et donne une sensation d'astringence en bouche ;

-**les flavanonols**, ou dihydroflavonols, qui ont une fonction cétone en C4 sur l'hétérocycle, mais également une fonction hydroxyle sur ce même cycle. On retrouve par exemple la taxifoline, présente dans l'açaï ;

-**les flavones**, des dérivés des flavanones qui comportent une double liaison entre les carbones C2 et C3 de l'hétérocycle (cycle C). Dans cette famille, l'apigénine est présente dans le persil ou encore la camomille ;

-**les flavonols**, qui comportent une hydroxylation du carbone C3 de l'hétérocycle. Les flavonols les plus connus sont la quercétine et le kaempférol, retrouvés dans le cacao, la myrtille et les oignons notamment ;

-**les isoflavones**, comme la daidzéine ou la génistéine par exemple, qui sont considérés comme des phytoestrogènes de par leur ressemblance structurale avec l'estrogène. Le soja est notamment connu pour en contenir ;

-les **anthocyanes**, qui sont sous forme d'aglycone (appelé anthocyanidine) ou couplées à un sucre. Ce sont des pigments rouges, utilisés par la plante pour attirer les insectes pollinisateurs par exemple. En œnologie, elles sont responsables de la couleur des vins rouges. On les retrouve également dans les mûres, les myrtilles ou encore les oranges sanguines et les aubergines.

Les flavonoïdes représentent la plus grande famille de polyphénols.

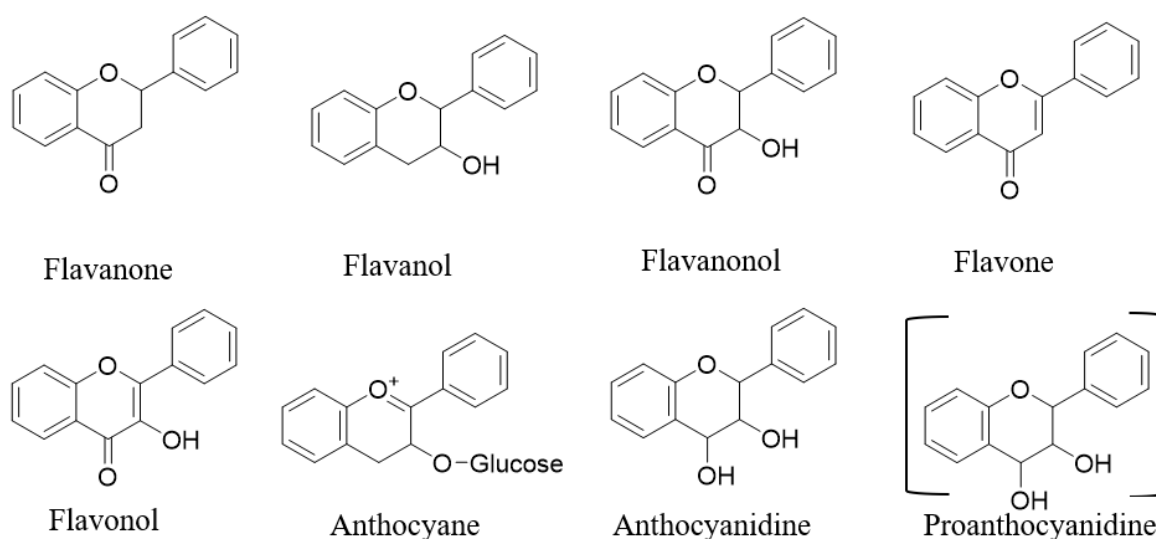


Figure 2. Structures de base des différents flavonoïdes

inspiré de Santos *et al.*, 2017 [8]

### *Les non flavonoïdes*

Les composés phénoliques non flavonoïdes se divisent généralement en deux grands sous-groupes :

-**les acides phénoliques**, qui sont constitués d'un cycle phénol, présentent également au moins une fonction carboxylique. La taille de la chaîne carbonée, et notamment la présence d'une double liaison entre la fonction carboxylique et le cycle, divise cette classe en deux groupes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, comme l'acide salicylique) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, comme l'acide coumarique). Les acides phénoliques sont des polyphénols largement retrouvés dans l'alimentation notamment dans le thé, le café, le chocolat, les fruits à coque, *etc* ;

-**les stilbènes**, qui ont une structure de base constituée de deux noyaux phényles reliés par un pont éthylène (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), ont comme molécule de base le resvératrol (Figure 3). Ce mot est issu de résorcinol, vérâtre et *para*-phénol. Le resvératrol est retrouvé sous deux formes : sa forme *-cis* et son isomère, la forme *-trans* (Figure 3).

Les stilbènes ont été caractérisés comme phytoalexines par Langcake et Pryce en 1977 [9]. Il a été démontré que la biosynthèse des stilbènes était stimulée par l'induction d'un stress, physique (exposition aux UV) ou biologique (infection par des agents pathogènes). Les stilbènes ont montré des propriétés de bioprotection, et notamment des activités antifongiques. En effet, les stilbènes de la vigne ont montré des propriétés contre *Plasmopara viticola* [10], *Fusarium graminearum* [11] ou encore *Botrytis cinerea* (en inhibant le développement mycélien) [12] et les stilbènes de la cacahuète contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* [13]. Les stilbènes de la vigne ont également des activités antibactériennes [14] et insecticides [15].

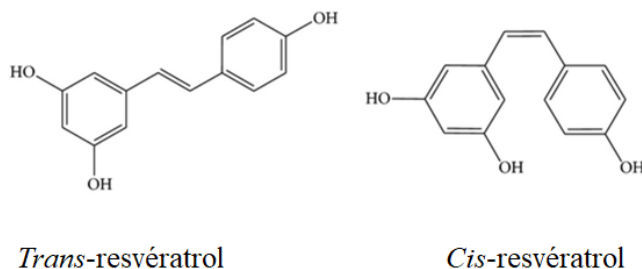


Figure 3. Structure des deux formes isomériques du resvératrol

## 1.2 Consommation des composés phénoliques

Plusieurs revues scientifiques tendent à estimer la consommation quotidienne de polyphénols, bien qu'il existe une grande variabilité multifactorielle de cette consommation.

Les polyphénols sont présents dans de nombreux aliments, notamment les fruits, les légumes, mais également les céréales, les légumineuses et les noix [16]. La distribution des différentes classes de polyphénols varie d'un aliment à l'autre ; ainsi, on retrouve en relativement grande quantité des acides phénoliques dans les pommes, les cerises et les baies, des flavonoïdes dans les pommes, les agrumes, les baies et le cacao, des tanins condensés dans les baies, des stilbènes dans les baies, le vin et les cacahuètes et des anthocyanes dans la pellicule des raisins [17,18]. En 2006, Brat *et al.*, ont mesuré la teneur en polyphénols totaux de nombreux aliments consommés de manière régulière en France, et ont ainsi montré que les légumes les plus riches étaient l'artichaut et le persil, quant aux fruits, les polyphénols étaient surtout concentrés dans la fraise, le litchi et le raisin. La base de données *Phenol-Explorer* [7] répertorie les teneurs en polyphénols dans les aliments. Grâce à cet outil, les chercheurs peuvent alors évaluer la consommation journalière en polyphénols de manière quantitative, mais également mettre en évidence les différentes familles de polyphénols consommées en fonction des aliments ingérés. Par ailleurs, plusieurs paramètres font varier l'apport journalier en polyphénols pour un seul et même aliment, comme son mode de préparation ou encore ses interactions avec la matrice alimentaire lors de la digestion [18,19].

En se basant sur les habitudes de consommation des français, il s'est avéré que l'apport des polyphénols dans notre alimentation se faisait principalement par la consommation de pommes et de fraises pour les fruits, et d'oignons, de pomme de terre et de laitue pour les légumes, les fruits apportant trois fois plus de polyphénols que les légumes [20]. Dans une autre étude, il a été montré que les trois boissons qui apportaient le plus de polyphénols étaient le café (44%), le thé (9%) et le vin rouge (6%). Cette étude réalisée sur près de 5000 français, évalue l'apport en polyphénols à 1,2 g/jour en moyenne. Cet apport est dû très majoritairement à la consommation de café (520 mg par jour) suivi de la pomme, du vin rouge et du chocolat noir [21].

Concernant d'autres pays d'Europe, il a été montré que les populations des pays méditerranéens avaient une alimentation plus riche en proanthocyanidines que les pays du nord de l'Europe par exemple, bien que la différence d'apport journalier en flavonoïdes ne soit pas significative (répertoire sur plus de 35 000 sujets) [22]. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence que les habitants du nord de l'Europe consommaient plus de polyphénols totaux [23].

Enfin, d'autres facteurs interviennent dans la variabilité de l'apport journalier en polyphénols, comme l'âge, le sexe et le niveau de vie.

## 2. Les stilbènes

Deux termes sont utilisés pour ces molécules : les stilbènes et les stilbénoides (Figure 4). Les stilbénoides sont un groupe plus large que les stilbènes (Figure 4), puisqu'ils contiennent notamment les bibenzyls, aussi appelés dihydrostilbènes (qui ne comportent pas de double liaison entre les deux cycles aromatiques) et les phénanthrènes (constitués de trois cycles benzènes fusionnés). Ainsi, on retrouve plus de 300 stilbènes et plus d'un millier de stilbénoides.

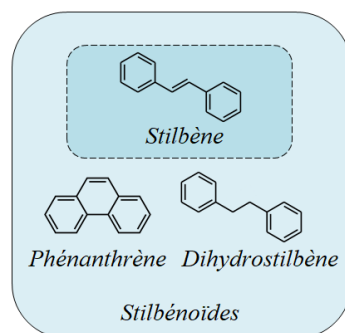


Figure 4. Stilbène et stilbénoides.

### 2.1 Les stilbènes : des monomères aux oligomères

La molécule monomérique de base, le resvératrol, peut subir différentes fonctionnalisations [24] sur l'un des deux noyaux aromatiques, et ainsi former d'autres monomères aux propriétés physico-chimiques et biologiques différentes. On retrouve communément des réactions de glycosylation, d'hydroxylation, de méthylation, mais également de prénylation, d'estérification ou de géranylation. Les monomères du resvératrol les plus communément étudiés sont répertoriés dans le tableau 1. D'autres monomères moins étudiés existent, comme le cudrastilbène par exemple (dérivé prénylé).

Tableau 1. Fonctionnalisation du resvératrol et principaux monomères formés

Fonctionnalisation	Groupement	Monomère
<b>Glycosylation</b>	+ glucose	Picéide, Astringine
<b>Hydroxylation</b>	+ OH	Picéatannol, Oxyresvératrol, Gnétol
<b>Méthylation</b>	+ OCH <sub>3</sub>	Isorhapontigénine
	+ CH <sub>3</sub>	Pinostilbène, Rhapontigénine
	+ 2(CH <sub>3</sub> )	Ptérostilbène
<b>Déshydroxylation</b>	- OH	Pinosylvine

Le resvératrol peut également s'oligomériser. La dimérisation du resvératrol et ses potentielles fonctionnalisations peuvent entraîner la formation de nombreux dimères. Parmi les plus répandus, nous pouvons citer le pallidol, l' $\omega$ -viniférine, l'ampélopsine A, la  $\delta$ -viniférine,

la parthenocissin A, la quadrangularin [25] et l' $\epsilon$ -viniférine [12], la molécule étudiée dans cette thèse. La biosynthèse de l' $\epsilon$ -viniférine se fait par dimérisation (couplage régio-isomérique) du resvératrol, dont le mécanisme hypothétique est schématisé en Figure 5. Des degrés de polymérisation supérieurs donneront des trimères ( $\alpha$ -viniférine, ampélopsine E, gnétine H), des tétramères (hopéaphénol, vitisine B), allant jusqu'au octamères [26].

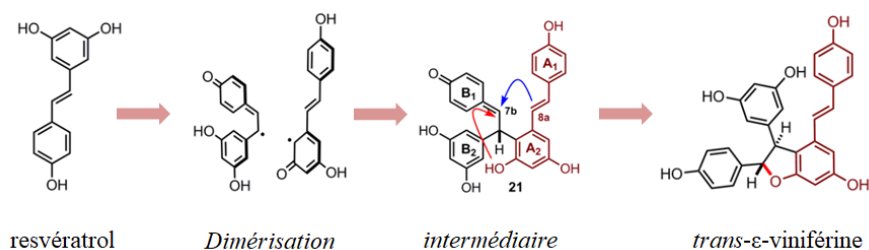


Figure 5. Mécanismes hypothétiques de la dimérisation pour former l' $\epsilon$ -viniférine

modifié de Keylor *et al.*, 2015 [27]

## 2.2 Distribution des stilbènes dans le règne végétal

C'est en 1940 que le resvératrol a été identifié pour la première fois dans le rhizome d'une plante retrouvée dans les massifs montagneux, la vérâtre blanche (*Melanthiaceae*) [28]. Depuis, plus de 300 molécules ont été identifiées comme appartenant à la famille des stilbènes. A la différence d'autres polyphénols, le resvératrol ainsi que ses dérivés qui composent cette famille ont été identifiés dans un nombre relativement restreint de familles de plantes. La revue de Rivière *et al.*, publiée en 2012, fait état de la distribution des stilbènes dans le règne végétal [29]. Ainsi, on les retrouve chez certaines bryophytes (végétaux non vascularisés) dans les familles des *Corsiniaceae* et *Lejeuneaceae*, chez certaines monilophytes (fougères) comme les *Ophioglossaceae* et les *Dryopteridaceae*, chez les gymnospermes où l'on trouve les *Gnetaceae* et les *Dropteridaceae*, et enfin chez certaines angiospermes. Les familles angiospermes dans lesquelles ont été identifiés les stilbènes sont les *Dioscoreaceae*, *Stemonaceae*, *Melanthiaceae*, *Smilacaceae*, *Haemodoraceae*, *Musaceae* et *Zingiberaceae*, et également chez les *Paeoniaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Fabaceae*, *Cyperaceae*, *Iridaceae*, *Gnetaceae*, *Cannabaceae* et *Vitaceae* [29]. Les *Vitaceae* représentent une famille de dicotylédones comprenant au moins 19 genres (*Ampelopsis*, *Cissus*, *etc.*) dont *Vitis*, plus connu sous son nom vernaculaire, vigne, et qui comporte plusieurs dizaines d'espèces. La plus connue est *Vitis vinifera* L., largement cultivée pour produire des raisins et du vin.

La teneur en stilbènes varie fortement d'une espèce à l'autre, tout comme la nature même des stilbènes (fonctionnalisations, degré d'oligomérisation). De plus, ces variations sont également identifiables au sein même d'un seul individu, selon l'organe ou la partie de plante étudié. En effet, Gabaston *et al.* (2019), ont mis en évidence une oligomérisation des stilbènes suivant un gradient parties aériennes / parties souterraines chez *Vitis vinifera* [30]. De plus, dans cette étude, ils ont montré des différences de concentrations mais également de degrés



d'oligomérisation entre les différentes associations cépages-porte-greffe. Il existe également des variabilités entre les cultivars [31,32].

### 2.3 Les stilbènes dans l'alimentation

#### 2.3.1 Aliments contenant des stilbènes

La base de données *Phénol-Explorer* apporte de nombreuses informations concernant la teneur en stilbènes dans l'alimentation. Ainsi, plusieurs stilbènes y sont présents, notamment les monomères (resvératrol, picéide, picéatannol, astringine, oxyresvératrol) et certains dimères (pallidol,  $\epsilon$ -viniférine,  $\delta$ -viniférine) et tétramères (hopéaphénol et isohopéaphénol) [33].

Les principales sources de stilbènes dans l'alimentation humaine sont issues des produits dérivés du raisin ; à savoir les vins, et notamment les vins rouges. D'autres baies contiennent des stilbènes monomériques, comme les myrtilles, les fraises, les mûres et les canneberges, bien que les concentrations soient bien inférieures à celles retrouvées dans le raisin [34]. Certains autres fruits contiennent des monomères comme les bananes, les ananas, les litchis, les amandes et les cacahuètes. Enfin, des stilbènes sont également retrouvés dans d'autres sources comme la bière [33].

Si le vin rouge est la principale source de stilbènes dans l'alimentation, il existe une forte variation de teneur en stilbènes dans les vins due à plusieurs facteurs tels que les paramètres viticoles (millésime, cépage, ensoleillement, maturité à la récolte) et les paramètres œnologiques (techniques de vinification) [35,36]. La concentration en stilbènes dans le vin a été l'objet d'une première étude en 1999 ; où Ribeiro de Lima *et al.* ont mis en évidence leur présence dans différents vins provenant de France, du Portugal et des Açores [37]. Ils ont ainsi mesuré le resvératrol et le picéide dans leurs deux formes isomériques, ainsi que la *trans*-astringine, et ont mis en évidence la prédominance du *trans*-picéide et de la *trans*-astringine (glucoside de picéatannol ou astringinine). De plus, cette équipe a calculé une moyenne en stilbènes dans les vins de 18,6 mg/L, avec des valeurs pouvant varier de 0,6 à 73 mg/L [37].

Récemment, Benbouguerra *et al.*, ont publié une revue scientifique rassemblant les études qui ont quantifié les stilbènes dans les vins et les baies de raisin [38]. Une partie des résultats est présentée dans le tableau 2. Deux études ont été prises en compte pour la détermination de la concentration en  $\epsilon$ -viniférine dans les vins rouges, élevant la moyenne à  $0,06 \pm 0,21$  mg/L. Sur un total de 17 vins analysés, l' $\epsilon$ -viniférine a pu être quantifiée dans seulement deux vins,  $0,10 \pm 0,01$  mg/L dans un vin rouge tunisien,  $0,805 \pm 0,047$  mg/L dans un vin espagnol (cépage Mourvèdre) [39,40]. Récemment, des traces de ce stilbène ont été détectées dans les vins blancs [40].

Tableau 2. Moyenne de la teneur en différents stilbènes dans les baies, les vins rouges et les vins blancs.

Modifié de Benbouguerra *et al.*, 2021 [38]

Molécules	Baies (mg/kg)	Vins rouges (mg/L)	Vins blancs (mg/L)
<i>Trans-resvératrol</i>	0,67 ± 0,97	1,41 ± 1,17	0,08 ± 0,2
<i>Cis-resvératrol</i>	0,01 ± 0,07	0,88 ± 1,07	0,04 ± 0,13
<b>Picéatannol</b>	0,12 ± 0,22	0,68 ± 0,94	0,04 ± 0,16
<i>Trans-picéide</i>	0,65 ± 1,30	2,06 ± 2,19	0,20 ± 0,39
<i>Cis-picéide</i>	0,71 ± 1,61	6,20 ± 8,09	0,68 ± 2,23
<i>Trans-astringine</i>	0,71 ± 0,58	0,52 ± 0,61	0,05 ± 0,16
<i>Cis-astringine</i>	0,12 ± 0,09	0,13 ± 0,32	0,11 ± 0,35
<i>Trans-ε-viniferin</i>	nd	0,06 ± 0,21	nd
<i>Trans-ω-viniferin</i>	nd	0,03 ± 0,1	nd
<b>Miyabenol C</b>	nd	0,14 ± 0,45	nd
<b>Hopeaphenol</b>	nd	0,08 ± 0,15	nd
<b>Isohopeaphenol</b>	nd	1,39 ± 1,80	nd
<b>R2-viniferin</b>	nd	0,42 ± 1,05	nd

### 2.3.2 Estimation de la consommation journalière de stilbènes

Peu d'études visent à mesurer la consommation journalière en stilbènes [33]. A ce jour et à notre connaissance, trois études ont permis de chiffrer la consommation journalière en stilbènes d'une population donnée (tableau 3). Selon une étude réalisée sur une population chinoise, l'apport journalier de stilbène *via* l'alimentation est estimé à 150 µg/jour/personne et serait principalement apportée par la consommation de raisin, de racines de lotus et de taros (choux) [41]. Selon une étude italienne sur 529 personnes âgées de plus de 65 ans, cet apport serait compris entre 0 et 3,2 mg/jour, de plus, 30 % de la population étudiée n'en consomment pas [42]. Enfin, l'étude contenant le plus grand nombre de sujets à notre connaissance a été publiée en 2008 par Zamora-Ros *et al.* Sur plus de 40 000 personnes, ils ont estimé, sur la base de questionnaires et d'une base de données des concentrations en stilbènes, un apport journalier en *trans-picéide* supérieur à celui du *trans-resvératrol*, avec dans les deux cas une consommation supérieure chez les hommes. Ils ont également estimé que plus de 98,4% de cet apport était dus à la consommation de vin et 1,6% à la consommation de raisin et jus de raisin [43].

Tableau 3. Études de la consommation journalière de stilbènes chez l'Homme

Pays	Nombre de sujets	Apport journalier en stilbène	Référence
<b>Espagne</b>	40 685	933 ± 1695 µg / jour resvératrol + picéide	[43]
		194 ± 354 µg/jour resvératrol	
		500 ± 965 µg / jour <i>trans-picéide</i>	
<b>Chine</b>	1394	150 µg/jour resvératrol	[41]
		140 µg/jour picéide	
<b>Italie</b>	529	500 µg/jour resvératrol	[42]

Les stilbènes sont donc présents dans notre alimentation, bien qu'ils le soient en faible quantité. De nombreuses études, ces dernières années ont mis en évidence des corrélations entre

l'apport alimentaire des polyphénols et l'amélioration de fonctions physiologiques. Par exemple, en 2017, une revue scientifique de méta-analyse fait l'état de l'art des publications qui corrélient la consommation de polyphénols avec la réduction de la pression sanguine et de l'hypertension chez l'Homme [44]. Ces liens étroits entre la consommation de polyphénols et les bénéfices santé ont poussés les chercheurs de la communauté scientifique internationale à étudier les différentes familles de polyphénols et leur impact sur la santé, dans le but de déterminer la molécule ou la famille de molécules potentiellement responsable(s) de ces effets biologiques.

### 3. Intérêts de la vigne pour la nutrition-santé

#### 3.1 *Vitis vinifera* dans le domaine des compléments alimentaires

##### 3.1.1 Les extraits de vigne dans les compléments alimentaires : réglementation

Les compléments alimentaires constituent « des denrées alimentaires dont le but est de compléter un régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique » (directive 2002/46 [45]). Ces compléments alimentaires sont vendus sous forme de poudre, de gélules, de capsules, de comprimés, de sachets, de compte-gouttes ou autres formes galéniques généralement dérivées de la filière pharmaceutique. Aujourd'hui en France et en Europe, la mise sur le marché des compléments alimentaires ne nécessite pas d'autorisation de mise sur le marché, contrairement aux médicaments.

Le décret sur les compléments alimentaires (2006-352 du 20 mars 2006 [46]) liste les plantes autorisées dans les compléments alimentaires. Associé à cette réglementation générale, l'arrêté français du 24 juin 2006 [47] sur les plantes et leur utilisation dans les compléments alimentaires indique bien que la graine, le fruit, la feuille et le bourgeon de *Vitis vinifera* sont autorisés dans les compléments alimentaires (dans la mesure où leur préparation est traditionnelle et non considérée comme *novel food* [48]). Ainsi, poudres ou extraits traditionnels de ces parties de *Vitis Vinifera* peuvent être notifiés auprès de la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes) selon la procédure de l'article 15 du décret sur le complément alimentaire [49], c'est-à-dire notifiés pour être mis sur le marché sans attendre. De plus, le resvératrol fait également partie des substances autorisées selon le règlement français. Le resvératrol d'origine microbien est également autorisé, selon le règlement de l'UE 2017/2470 qui reconnaît ce stilbène comme un *novel food*. Aujourd'hui en France, plus de 250 compléments alimentaires contenant *Vitis vinifera* sont présents sur le marché [50].

##### 3.1.2 Les allégations santé

Une allégation santé est définie comme « tout message ou toute représentation non obligatoire en vertu de la législation qui affirme, suggère ou implique l'existence d'un lien entre une denrée alimentaire ou l'un de ses composants et la santé » (réglementation 1924/2006). Pour la vigne, une cinquantaine de demandes d'allégation ont jusqu'alors été déposées, concernant

des axes santé « antioxydant », « circulation », « défense naturelle » ou « peau » principalement. La moitié des dossiers est en attente d'évaluation et l'autre moitié a été refusée. Pour obtenir une allégation santé, un dossier scientifique doit être déposé auprès de l'agence européenne des aliments (EFSA) qui émet ensuite un avis (positif ou négatif) lui-même alors publié sous forme de règlement par la commission européenne. Ce dossier doit pouvoir démontrer l'innocuité de l'ingrédient et démontrer son efficacité dans le domaine de santé souhaité. Au-delà de la démonstration clinique obligatoire, les experts de l'EFSA attendent une démonstration de la compréhension de l'activité mise en avant.

### 3.2 Les études d'efficacité des extraits de raisin et de vigne

Concernant *Vitis Vinifera*, de nombreuses études cliniques ont été menées, visant à déterminer l'impact d'un apport par voie orale d'un extrait ou d'une molécule pure sur un axe santé prédéfini. La base de données *ClinicalTrial* [51] regroupe toutes les études cliniques privées et publiques menées à travers le monde [51]. A ce jour, plus de 250 études cliniques disponibles sur cette base de données concernent une administration d'un extrait de *Vitis Vinifera*. Les applications principales concernent les fonctions vasculaires, les fonctions cognitives et également l'hypertension, la circulation sanguine, l'athérosclérose, le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité et l'inflammation.

Parmi ces études, nous pouvons notamment citer celle de Tomé-Carbeiri *et al.* (2012), qui a été réalisée en triple aveugle et de façon randomisée. Dans cette étude réalisée sur 75 patients, un groupe a reçu un extrait de vigne enrichi en resvératrol (Stilvid®), un autre groupe a reçu un extrait de vigne pauvre en resvératrol et le dernier groupe a reçu le placebo, quotidiennement pendant 6 mois. Les résultats de cette étude indiquent que le groupe ayant reçu l'extrait enrichi en resvératrol présentait des concentrations plasmatiques diminuées en marqueurs de l'inflammation, comme la protéine C-réactive, le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) et certaines interleukines, entre autres [52]. La diminution de TNF- $\alpha$  dans le sang a également été démontrée après 6 semaines de consommation journalière de raisins secs [53]. Le TNF- $\alpha$  et la protéine C-réactive ont également diminué dans un autre essai clinique, réalisé sur 40 patients souffrant d'obésité et ayant reçu quotidiennement 2 g d'extrait de pépins de raisin pendant trois mois [54].

Une dernière étude semble importante à mentionner dans le cadre de cette thèse ; il s'agit de l'étude clinique de Khoshbaten *et al.* (2010). Quinze patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), ont reçu 2 g par jour d'extrait de pépins de raisin. Ces extraits, en plus de diminuer la concentration sanguine d'alanine amino transferase (ALT, un marqueur de lyse hépato-cellulaire), ont amélioré de façon significative le degré de stéatose hépatique des patients [55].

Ces essais cliniques, bien que réalisés sur un nombre restreint de patients, témoignent des effets bénéfiques d'extraits de *Vitis vinifera* tels que des effets anti-inflammatoires et anti-stéatosiques. Pour comprendre les mécanismes d'action de ces extraits, il est important de pouvoir déterminer le devenir de ces extraits au sein de l'organisme et les molécules (formes natives et métabolisées) responsables des propriétés biologiques mesurées chez l'Homme.

## ***Chapitre 2. Biodisponibilité, absorption et métabolisme des stilbènes***

La biodisponibilité d'une molécule représente sa fraction atteignant la circulation systémique. Cette définition, initialement exclusivement utilisée en pharmacologie, s'étend maintenant à la nutrition pour déterminer la durée et l'intensité d'exposition de l'organisme à des composés d'intérêt. Ces composés, une fois ingérés, vont subir les quatre processus connus en pharmacocinétique, à savoir :

- **l'absorption**, c'est-à-dire la capacité du composé à passer la barrière intestinale pour rejoindre la circulation ;
- **la distribution**, autrement dit les tissus cibles qui vont accumuler la molécule ou ses métabolites ;
- **le métabolisme**, à savoir les biotransformations que subit la molécule, principalement au niveau hépatique mais également au niveau intestinal et tissulaire ;
- **l'élimination**, qui concerne très largement les voies rénales, biliaires et intestinales.

L'étude de la biodisponibilité et du métabolisme de composés d'intérêt permet de mieux comprendre leur devenir dans l'organisme pour mieux appréhender leurs propriétés biologiques. Dans ce chapitre seront présentés le système digestif dans sa globalité, ainsi que les mécanismes impliqués dans l'absorption et le métabolisme des stilbènes. Enfin, les données bibliographiques disponibles sur l'absorption, le métabolisme et la biodisponibilité de l' $\epsilon$ -viniférine seront résumées.

### **1. Généralités sur le système digestif**

Par définition, la digestion représente l'ensemble des transformations mécaniques et chimiques que subissent les aliments avant d'être assimilés ou non. Ce processus implique le tube digestif (TD), divisé en plusieurs segments, ainsi que les glandes sécrétoires impliquées dans la digestion comme les glandes salivaires et le pancréas.

#### ***1.1 Les différentes composantes impliquées dans le processus de digestion***

Le schéma général ci-après (Figure 6) permet de visualiser l'ensemble des organes et segments du TD impliqués dans la digestion.

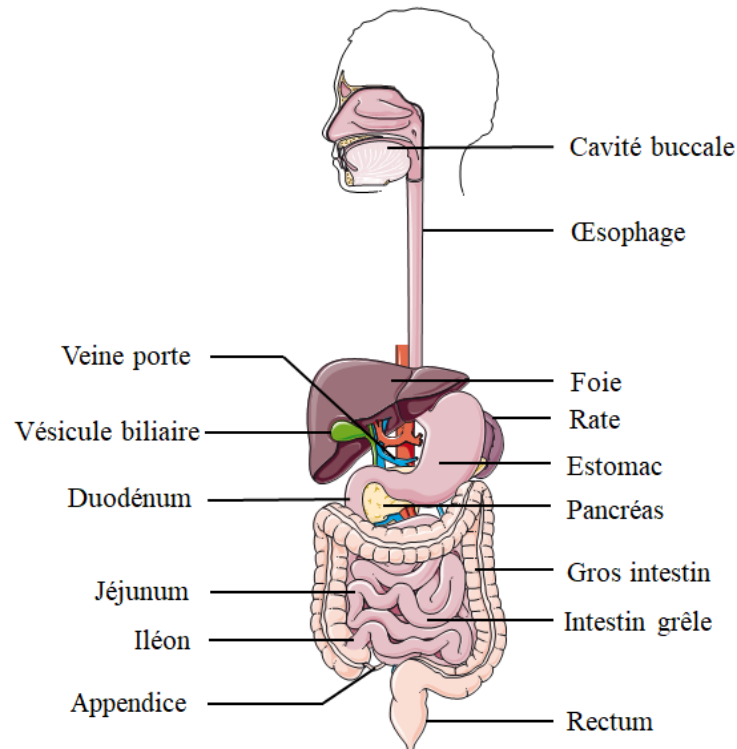


Figure 6. Schéma général du système digestif

**La cavité buccale** est le premier site impliqué dans la digestion. Cette cavité est notamment constituée de la langue, des dents et des glandes salivaires. C'est le premier lieu de la digestion qui intervient de manière mécanique (mastication) et chimique.

**Les glandes salivaires** de la cavité buccale se divisent en trois catégories : les glandes parotides, sous maxillaires, et sublinguales. La salive ainsi produite contient des amylases, qui initient la digestion chimique par clivage des liaisons glycosidiques de l'amidon. Après déglutition, le bol alimentaire de la cavité buccale va rejoindre le tube digestif, constitué de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin.

**L'œsophage** relie cette cavité buccale à l'estomac (au niveau du cardia) et mesure environ 25 cm de longueur chez l'Homme. L'épithélium de l'œsophage est de type pavimenteux et stratifié, et forme des replis qui viendront s'effacer au passage du bol alimentaire après déglutition.

**L'estomac** est constitué du fundus, du corps, de l'antrum pylorique et du pylore. Il est relié du côté apical à l'œsophage par le cardia (sphincter) et au niveau basal au duodénum par le pylore. Son épithélium est constitué de cellules à mucus, de cellules pariétales, de cellules souches et neuroendocrines (production de gastrine) ainsi que de cellules principales qui vont sécréter des pepsinogènes et lipases gastriques.

Cet organe a plusieurs fonctions dans la digestion : une fonction mécanique (brassage du bol alimentaire qui arrive de l'œsophage) et une fonction chimique. En effet, l'estomac produit de nombreuses substances permettant la digestion des aliments et constituant le suc gastrique : l'acide gastrique (contenant l'acide chlorhydrique) qui dénature les protéines, la pepsine qui clive les protéines, la rennine et la lipase gastrique qui initient la digestion des glucides. C'est

la partie du TD la plus acide, avec un pH compris entre 1 et 3, permettant ainsi l'activation de la pepsine et ayant un rôle bactéricide.

**La vésicule biliaire** est une poche de réserve située sous le foie. Elle contient la bile, produite par les hépatocytes au niveau du foie, qui est constituée principalement de sels biliaires. Cette bile va alors se déverser dans l'intestin grêle par les canaux biliaires. Les sels biliaires vont alors permettre la digestion des lipides.

**Le pancréas** est une glande qui exerce une fonction endocrine (sécrétion d'hormones régulatrices du métabolisme des glucides) et exocrine en produisant les sucs pancréatiques après stimulation par le nerf vague. Ces sucs pancréatiques sont constitués de peptidases, glucosidases, lipases, et nucléases qui vont se déverser dans le duodénum par le canal cholédoque. De plus, ils vont neutraliser le pH du chyme (bol alimentaire arrivé dans l'intestin) tout juste sorti de l'estomac.

**L'intestin grêle** se divise en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. L'épithélium de l'intestin grêle est principalement constitué d'entérocytes. Il contient également des cellules caliciformes (cellules à mucus), des lymphocytes, des cellules souches, des cellules entéro-endocrines et des cellules de Paneth (cellules séreuses). La principale particularité de l'épithélium réside dans ses différents niveaux de replis : les valvules conniventes de la muqueuse, les villosités intestinales ainsi que les microvillosités du pôle apical des entérocytes qui composent l'épithélium. Ces replis augmentent considérablement la surface d'échange de ce segment (plus de 30 m<sup>2</sup> chez l'Homme [56]).

La principale fonction de l'intestin est l'absorption, dont les principaux acteurs sont les entérocytes, cellules polarisées qui présentent des jonctions serrées responsables de l'étanchéité de l'épithélium. Les mécanismes impliqués dans l'absorption seront détaillés dans la partie A.2. L'intestin grêle a une fonction mécanique (progression du chyme) mais aussi et surtout chimique. La bile issue du foie, les sucs pancréatiques issus du pancréas et la sécrétion des cellules de l'épithélium interviennent dans la digestion du chyme en le transformant en éléments assimilables. Après digestion, les monosaccharides, acides aminés, acides gras et monoglycérides seront alors absorbés et gagneront le foie. L'intestin grêle a également une fonction endocrine et immunitaire.

**Le gros intestin ou côlon** se différencie de l'intestin grêle d'un point de vue anatomique par sa largeur supérieure et débute au niveau de caecum. Il n'a pas d'amplification de sa surface d'échange, et à la différence de l'intestin grêle, contient plus de cellules caliciformes (cellules à mucus) que d'entérocytes. Le côlon contient par ailleurs un microbiote important impliqué dans la fermentation et la putréfaction, libérant ainsi des gaz. La fonction principale du côlon est la résorption d'eau et d'électrolytes ainsi que la propulsion des fécès.

Le TD, bien qu'ayant des segments aux fonctions différentes, présente la même organisation histologique de base schématisé en Figure 7, à savoir :

- la muqueuse, qui est en contact direct avec la lumière du TD. Cette couche est constituée de l'épithélium, du chorion (ou *lamina propria*) et de la *muscularis mucosae*. La constitution de l'épithélium varie selon les segments et aura différentes fonctions (sécrétion pour l'estomac, absorption pour l'intestin grêle et lubrification pour le gros intestin. Le chorion est le tissu conjonctif sous-jacent à l'épithélium ; il est lâche et vascularisé et contient des follicules

lymphoïdes. Enfin, la *muscularis mucosae* est la jonction entre la muqueuse et la couche suivante.

- la sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif plus dense que celui de la muqueuse. De plus, ce tissu est innervé par le système nerveux sympathique, composante du système nerveux autonome qui contrôle les fonctions automatiques de l'organisme. La sous-muqueuse contient également des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que le plexus nerveux de Meissner (plexus du système nerveux entérique qui contrôle la motilité du système digestif).

- la musculuse est constituée de deux sous-couches de cellules musculaires lisses (fusiformes uninucléées) ; une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Entre ces deux couches se trouve le deuxième plexus du système nerveux entérique : le plexus d'Auerbach.

- l'adventice (ou séreuse) constitue la tunique externe du TD. Constituée de tissu conjonctif lâche, l'adventice permet de lier le tube digestif aux organes environnant. Il est très vascularisé et contient des adipocytes.

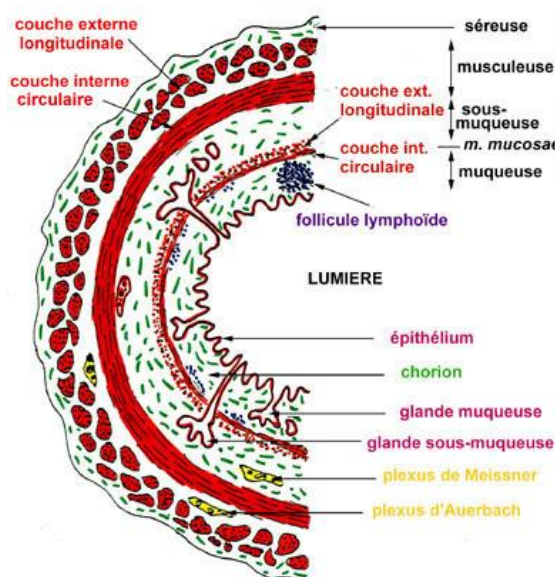


Figure 7. Organisation générale du tube digestif [56]

### 1.2 L'intestin, site d'absorption et de biotransformations

Bien qu'il existe une absorption stomacale, la grande majorité de l'absorption se fait au niveau de l'intestin grêle, dont les replis apportent une grande superficie d'échanges entre la lumière du tube digestif et le système vasculaire se déversant dans la veine porte. C'est dans cette partie, et plus particulièrement dans le jéjunum, que les molécules vont être absorbées, sous leur forme native ou non, pour ensuite rejoindre le foie. Les molécules peuvent entrer dans les entérocytes par voie passive, ou par voie active.

Le transport passif se fait par diffusion selon un gradient de concentration, de manière simple ou facilitée par une protéine porteuse. Le transport actif, qui peut être primaire (utilisation de l'adénosine triphosphate, ATP) ou secondaire, s'effectue contre le gradient de concentration. Les transports actifs secondaires utilisent de l'énergie fournie par une différence



de potentiel électrochimique après passage d'un second composé dans le sens de son gradient de concentration ; et peuvent être antiport (les transports des deux espèces chimiques sont de sens opposé) ou symport (les transports des deux espèces chimiques sont dans le même sens).

Au niveau de l'intestin, les transporteurs les plus courants sont les transporteurs de glucose (*glucose transporter 1*, GLUT1, transport passif et *sodium-glucose cotransporter 1*, SGLT1, actif secondaire symport en phase apical, *glucose transporter 2*, GLUT2 en phase basolatérale), et les transporteurs liant l'ATP (transporteur ABC pour ATP Binding Cassette). Les transporteurs ABC représentent une grande famille de transporteurs membranaires actifs primaires. On retrouve dans cette grande famille les *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP), dont les protéines s'expriment dans différents segments du TD au niveau apical et basolatéral des entérocytes [57], ainsi que la P-glycoprotéine (Pgp), qui est retrouvée au niveau apical et principalement impliquée dans l'efflux. Les *organic anion transporting polypeptide* (OATP) sont également des transporteurs impliqués dans l'absorption des composés.

### 1.3 Le métabolisme intestinal et hépatique des xénobiotiques

Le foie est l'organe principal du métabolisme. Cependant, plusieurs tissus périphériques contiennent le matériel enzymatique nécessaire à ces réactions et sont donc impliqués dans les réactions du métabolisme des xénobiotiques.

Le métabolisme désigne l'ensemble des réactions métaboliques et biologiques que subit une molécule. On retrouve deux grandes catégories : les réactions de phase I et de phase II.

**Le métabolisme de phase I** est constitué principalement des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydratation ou d'hydrolyse. Elles font intervenir les enzymes du cytochrome P450 (CYP450), pour les réactions d'hydroxylation, des enzymes de N-oxydation et de S-oxydation pour les réactions d'oxydation, des nitroréductases et azoréductases pour les réactions de réductions, et des estérases, diacétylase, glucuronidases, sulfatase et glucosidase pour les hydrolyses [58]. Les réactions fortement majoritaires dans le métabolisme de phase I restent les réactions d'oxydation, visant à introduire une nouvelle fonction chimique aux molécules, pour faciliter leur élimination ou permettre leur conjugaison.

**Le métabolisme de phase II** est un métabolisme de conjugaison. Il s'agit principalement de glucurono-conjugaison, de conjugaison au glutathion, de sulfoconjugaison, de conjugaison aux acides aminés, d'acétylation et de méthylation. Ces réactions font intervenir des enzymes telles que les glutathion S-transférases, N-acétyltransférases, Uridine diphosphate glucuronosyl transférases (UGT), sulfo-transférases (SULT), acyl-transférase et méthyl-transférase.

La fonction principale des réactions du métabolisme de phase II est d'augmenter le caractère hydrophile des xénobiotiques afin de faciliter leur élimination, en agissant directement sur la molécule (ajout d'un groupement polaire sur un radical hydrophile des molécules) ou sur les métabolites des molécules ayant subi le métabolisme de phase I.

Le foie est le lieu principal du métabolisme. Dans cet organe a lieu le métabolisme des glucides (stockage des sucres alimentaires ou libération de glucose en cas d'hypoglycémie), des lipides (absorption des chylomicrons) et des protides (dégradations des peptides).

Le foie est constitué à 80% d'hépatocytes, cellules centrales du métabolisme. En effet, ces cellules contiennent la plus grande concentration mais également la plus grande diversité en enzymes du métabolisme de phase I et de phase II. Par conséquent, le foie peut avoir une activité métabolique jusqu'à 50 fois supérieure à celle de l'intestin. Les xénobiotiques entrent dans les hépatocytes *via* les transporteurs de type OATP, entre autres, alors que leur efflux est principalement médié par les MRP et Pgp. Dans la cellule, le CYP450 3A4 (CYP3A) représente 50% des cytochromes du foie [59], une des oxydases les plus importantes dans le métabolisme des xénobiotiques. Les UGTs, présentes dans les membranes du réticulum endoplasmique, sont également majoritairement exprimées dans le foie [60], ainsi que les enzymes de sulfatation SULT [61]. Les *glutathione S-transferases*, localisées dans le cytosol, la mitochondrie ou le péroxysome [62,63], sont également majoritairement retrouvées dans les cellules du foie [64]. Enfin, les enzymes d'acétylation, de méthylation ou de liaison aux acides aminés sont également majoritairement retrouvés dans les hépatocytes [61].

Les xénobiotiques et leurs métabolites formés dans les hépatocytes ont deux voies possibles. Ils peuvent rejoindre la circulation systémique *via* la veine cave, et passeront d'abord par les poumons (*via* le cœur droit) avant de rejoindre les tissus périphériques (*via* le cœur gauche) et d'être ensuite éliminés par le système urinaire, ou passer par les canalicules biliaires et rejoignent la bile. Ils seront alors déversés dans les intestins, et pourront alors être déconjugés et/ou absorbés de nouveau : c'est la circulation entéro-hépatique, ou bien éliminés dans les fécès.

Bien que les entérocytes soient responsables de l'absorption des composés, ils sont également impliqués dans le métabolisme. La présence de CYP450 dans ces entérocytes permet le métabolisme de phase I [65–67]. De plus, des clivages peuvent également avoir lieu dans ces entérocytes, par les glucosidases et sulfatases. Une fois transformés, les composés rejoignent soit le niveau apical, soit le niveau basal, ou ils seront transportés par la veine porte pour rejoindre le foie [58].

Au niveau du côlon, les molécules pourront également être métabolisées par le microbiote intestinal qui représente en moyenne 2 kg chez l'Homme.

#### **1.4 Le microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des microorganismes qui vivent en symbiose, ou non, dans le TD. Il est présent dès la naissance par transmission du microbiote cutané et/ou vaginal de la mère [69]. Cet écosystème est composé de champignons, archées et virus, mais surtout de bactéries dont les familles majoritaires sont les Firmicutes et les Bacteroïdètes. Chez l'homme, il a été mis en évidence que le TD possède de  $10^{12}$  à  $10^{14}$  microorganismes. Tout au long du TD, l'environnement (oxygène et pH principalement) va déterminer la composition du microbiote. De plus, le microbiote est fortement influencé par

l'alimentation. Par conséquent, il existe une forte variabilité inter-individu et ainsi, chez l'Homme, chaque individu possède un microbiote qui lui est propre.

Ce microbiote est fortement impliqué dans la digestion, en assurant l'hydrolyse de l'amidon, de la cellulose et des polysaccharides par exemple. Il est également étroitement lié à l'immunité. En conséquence, une dysbiose intestinale, c'est-à-dire une altération quantitative et/ou qualitative dans les différentes familles de bactéries, comme par exemple une diminution du rapport Bacteroïdètes / Firmicutes, peut entraîner des troubles métaboliques à l'origine de nombreuses maladies digestives, comme la maladie de Crohn ou les colopathies fonctionnelles [69]. Enfin, ce microbiote intestinal est impliqué dans l'absorption des xénobiotiques, généralement en clivant les molécules pour faciliter leur absorption intestinale.

## 2. Absorption et métabolisme des stilbènes

Les stilbènes sont connus pour avoir une très faible biodisponibilité, c'est-à-dire qu'un faible pourcentage de la molécule administrée est retrouvé dans la circulation générale. Deux principaux mécanismes sont responsables de cette faible biodisponibilité : l'absorption intestinale et le métabolisme. La biodisponibilité des stilbènes dépend de plusieurs facteurs, propres à la molécule (nombre de groupement hydroxyle, solubilité, polymérisation, degré de glycosylation, *etc.*), à l'environnement (mode d'administration, interaction avec la matrice alimentaire) ou à l'individu. En effet, il existe entre les individus une grande variabilité dans l'expression des enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme et l'absorption, ainsi qu'une grande variabilité de la composition du microbiote intestinal impliqué dans le métabolisme des composés.

Ce paragraphe expose les mécanismes d'absorption et de métabolisme des stilbènes, en s'appuyant sur les études réalisées *in vitro* sur les enzymes, substrats et transporteurs impliqués dans ces mécanismes.

### 2.1 Absorption et métabolisme intestinaux des stilbènes

Les résultats décrits dans ce paragraphe concernent majoritairement le resvératrol. Les travaux concernant l' $\epsilon$ -viniférine seront quant à eux détaillés dans le paragraphe suivant.

La majorité des études *in vitro* visant à caractériser l'absorption des stilbènes au travers de la barrière intestinale ont été réalisées en utilisant la lignée cellulaire Caco-2. Cette lignée, issue d'un adénocarcinome colique humain, s'organise en une monocouche présentant les caractéristiques de l'épithélium intestinal. Les cellules Caco-2 cultivées à confluence ont la capacité de se différencier en entérocytes et de se polariser pour présenter un pôle apical (lumen) et un pôle basolatéral (circulation sanguine). Cette lignée est donc idéale pour étudier le passage transcellulaire dans le sens apico-basal ou le sens baso-apical et également les systèmes de transport impliqués au niveau des membranes. Dans ces études, les cellules Caco-2 sont cultivées sur des inserts comme schématisé en Figure 8.

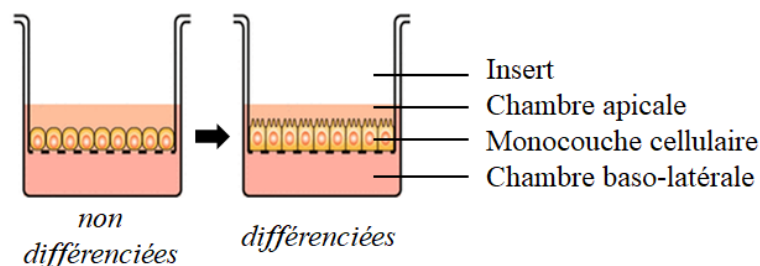


Figure 8. Différenciation de la lignée cellulaire Caco-2. Ces cellules se différencient et se polarisent, présentant un pôle apical et baso-latérale. modifié de Léa Tor [70]

L'utilisation de la lignée cellulaire Caco-2 au laboratoire a permis de mettre en évidence les mécanismes d'absorption mais également de métabolisme du resvératrol et du picéide, un glucoside du resvératrol. Ainsi, Henry et al. (2005), ont montré une accumulation intracellulaire de resvératrol quatre fois plus importante en comparaison au picéide [71]. L'inhibition de la phosphorylation de l'ATP (et donc des transporteurs membranaires actifs) a permis de constater que le resvératrol entrait dans la cellule de manière passive, contrairement au picéide qui utilise un transport actif. Enfin, l'utilisation d'inhibiteur de SGLT1 a montré que ce transporteur était impliqué dans le passage de la membrane apicale de l'entérocyte.

Henry *et al.* (2005) ont également mis en évidence un efflux très rapide de ces deux composés. L'utilisation d'inhibiteur de transporteurs membranaires a permis d'étudier les protéines impliquées l'efflux des composés. Ainsi, l'inhibition de MRP2, qui a entraîné une accumulation des deux composés à l'intérieur des cellules, témoigne de l'implication de cette protéine transmembranaire dans l'efflux apical [71]. Enfin, une exposition des cellules au picéide a entraîné une déglycosylation de la molécule et un passage au niveau baso-latéral de la forme aglycone, le resvératrol. Cette déglycosylation fait intervenir les enzymes Lactase Phlorizin Hydrolase (LPH) à la surface des entérocytes et Cytosolic- $\beta$ -Glucosidase (CBG) en intracellulaire[72].

Henry-Vitrac *et al.* (2006) [72], ont montré une glucuronidation et une sulfatation du resvératrol dans les cellules Caco-2. Ce métabolisme a également été mis en évidence par d'autres équipes [57,73]. La glucuronidation du resvératrol se ferait préférentiellement en position 3[74]. Kaldas *et al.* (2010), ont montré une sulfatation du resvératrol, ainsi qu'un efflux baso-latéral *via* le transporteur apical MRP2 [75]. L'utilisation des cellules Caco-2 a donc permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes relatifs à l'absorption et au métabolisme du resvératrol et du picéide, schématisé en Figure 9.

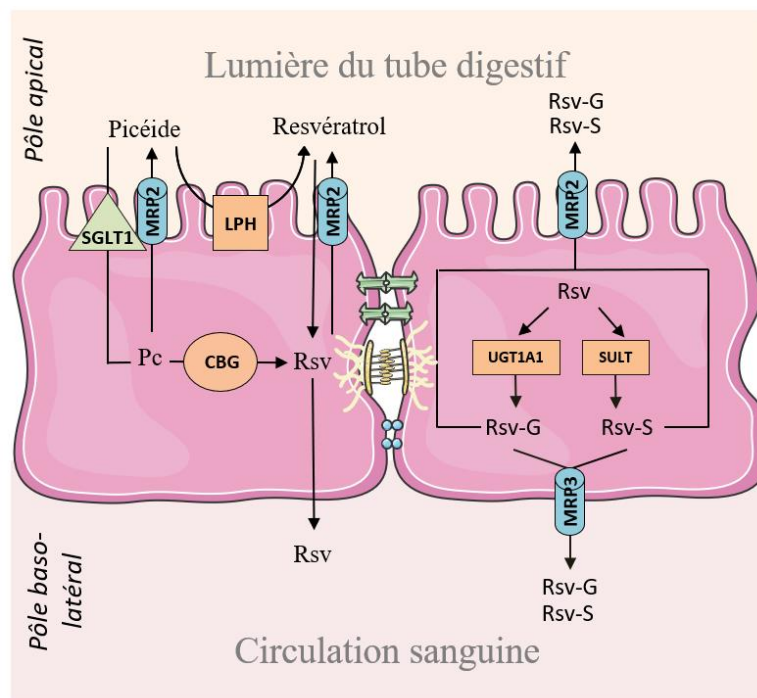


Figure 9. Mécanismes impliqués dans l'absorption et le métabolisme du resvératrol et du picéide dans les entérocytes. Différentes protéines transmembranaires sont impliquées dans l'absorption des composés depuis la lumière du tube digestif. Au sein même des entérocytes, les composés peuvent subir un métabolisme. Rsv : resvératrol et Pc : picéide

Ce métabolisme intestinal, mis en évidence sur cellules, a également été démontré en utilisant des fractions microsomales ou après perfusions intestinales [74,76] chez le rat. Après l'étude *in vitro* sur des microsomes issus de différentes sections du TD d'humains, Sabolovic *et al.* (2006), ont montré une forte variabilité inter-individu dans le métabolisme du resvératrol, et également une variabilité selon les différentes sections étudiées [74]. Cette équipe a montré l'implication de plusieurs isoformes des UGT dans la glucuronidation chez l'homme : UGT1A1, 1A6, 1A8, 1A9 et 1A10 [74].

La lignée cellulaire Caco-2 a également été utilisée pour l'étude d'autres stilbènes. Liu *et al.* (2019), et Sun *et al.* (2015), ont mis en évidence l'accumulation intracellulaire du ptérostilbène et son transport transcellulaire [77,78]. Jarasova *et al.* (2020), ont mis en évidence la glucuronidation du dihydroresvératrol (un métabolite du resvératrol issu du métabolisme du microbiote) [79]. L'oxyresvératrol a également été l'objet d'une étude, et il a été démontré que les transporteurs Pgp et MRP étaient impliqués dans son efflux [80,81]. Des stilbènes de plus grand poids moléculaire et de plus grand degré de polymérisation ont également été détectés dans ou à la surface des cellules Caco-2, comme l' $\epsilon$ -viniférine (dimère) ou l'hopéaphénol (tétramère) [82].

## 2.2 Métabolisme hépatique des stilbènes

Après passage au travers des entérocytes, les stilbènes, métabolisés ou non, gagnent le foie. Plusieurs équipes ont mis en évidence un métabolisme hépatique de ces molécules. Ces études peuvent se réaliser *in vitro*, selon quatre méthodes :

- la culture de lignées cellulaires hépatocytaires, comme la lignée HepG2 (homme) ou AML-12 (souris), qui disposent de tout le matériel enzymatique nécessaire au métabolisme ;
- les fractions hépatiques de type S9, qui sont un surnageant d'homogénat intracellulaire de foie et contiennent les enzymes et substrats du métabolisme ;
- les microsomes hépatiques ; qui sont une fraction de réticulum endoplasmique de cellules hépatiques ;
- les enzymes et leurs substrats isolés.

Le métabolisme *in vitro* du resvératrol a été démontré dès les années 2000, avec une sulfatation de ce composé par des microsomes de foie humain [83] ainsi qu'une glucuronidation, qui se fait préférentiellement en position 3 [84]. Cette glucuronidation régio-sélective fait intervenir plusieurs isoformes de l'enzyme UGT (1A1, 1A7, 1A9, 1A10 et 1A6 qui est lui uniquement pour la forme *-cis*) [84]. En 2010, Brill *et al.*, ont confirmé l'implication de l'UGT-1A1 pour la glucuronidation en 3, et ont mis en évidence l'implication de l'UGT1A4 pour la glucuronidation en position 4'. En utilisant également des fractions intestinales, les auteurs ont montré que la glucuronidation du resvératrol était dix fois plus élevée après utilisation de microsomes humains intestinaux qu'hépatiques [85]. Enfin, l'enzyme CYP1A2 engendre la formation de tétrahydroxystilbène lorsque le resvératrol est au contact de microsomes de foie humain [86].

De plus, l'utilisation de microsomes a permis de mettre en évidence les variabilités inter-espèce de la glucuronidation du resvératrol : pour la souris et le rat, la glucuronidation se fait presque exclusivement en position 3, à la différence de l'homme et du chien où le resvératrol est également glucuronidé de façon significative en position 4' (Figure 10) [87]. Dans cette étude de Maier-Salamon *et al.* (2011), l'augmentation de la dose de resvératrol administrée a entraîné une diminution de son métabolisme relatif chez l'homme et le chien, suggérant que seuls le rat et la souris avaient des mécanismes d'auto-activation de la glucuronidation [87]. Le métabolisme du resvératrol a également été démontré *in vitro* sur la lignée cellulaire HepG2 [88], et plus récemment encore sur une autre lignée hépatocytaire AML-12 [89].

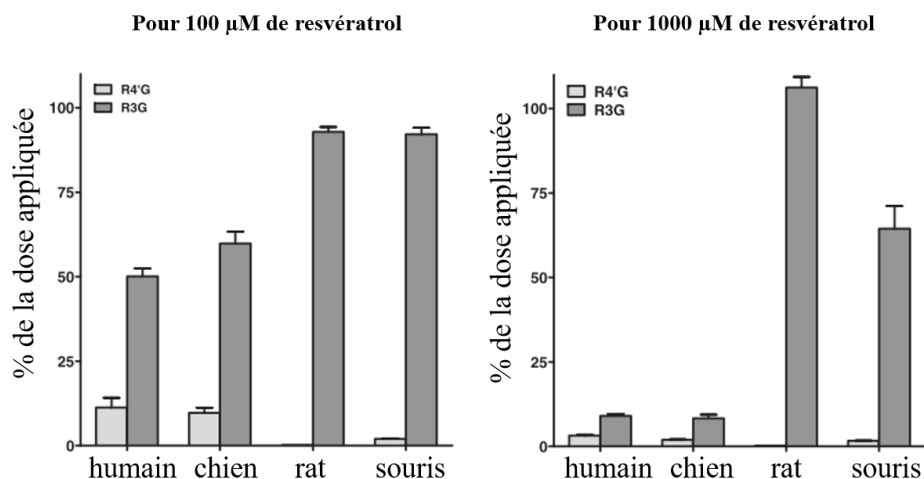


Figure 10. Glucuronidation en 3 (R3G) et 4' (R4'G) du resvératrol à 100 ou 1000 µM sur microsomes de différentes espèces

selon Maier-Salomon *et al.* (2011) [87]

L'utilisation de microsomes hépatiques a permis de mettre en évidence le métabolisme d'autres stilbènes, comme la glucuronidation du picéide [91] (2 isoformes de glucuronide), la glucuronidation du picéatannol [92] (3 isoformes de glucuronide) ou encore la sulfatation du picéatannol (deux monosulfates et un disulfate) [93]. Des réactions de méthylation ont également été observées en utilisant des cytosols de foie d'humain : ainsi, le picéatannol subit une méthylation et forme alors de la rhapontigénine et de l'isorhapontigénine impliquant l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase [94].

### 2.3 Les interactions avec le microbiote intestinal

Les stilbènes étant faiblement absorbés au niveau de la barrière intestinale, ils peuvent atteindre le colon, où se situe la plus grande population du microbiote intestinal, du fait du faible niveau d'oxygénation notamment [95].

A l'instar des polyphénols [96,97], le resvératrol a montré des propriétés biologiques intéressantes dans le maintien du microbiote intestinal. En effet, le resvératrol entraîne par exemple une diminution de la croissance cellulaire des entérobactéries [98]. Il diminue également la croissance d'*Enterococcus faecalis* (Firmicute), augmentant le rapport Bactéroïdetes / Firmicutes, luttant ainsi contre la dysbiose induite par un régime riche en graisses [99].

Les espèces qui constituent le microbiote intestinal ont également un impact métabolique sur les polyphénols et donc les stilbènes, grâce aux enzymes qu'elles produisent. Ce métabolisme implique notamment le clivage des liaisons glycosidiques [96], mais il a également été rapporté des activités d'estérification, de déméthylation, de dé-hydroxylation et de décarboxylation [95]. Après des expériences de fermentation *in vitro*, Bode *et al.* (2013), ont mis en évidence que la formation de dihydro-stilbènes était associée aux bactéries *Slackia equolifaciens* et *Adlercreutzia equolifaciens* [100]. Dans cette même étude, ils ont administré du resvératrol (500 µg/kg pc) à l'homme, et ont décelé dans les urines du dihydro-resvératrol, mais également du di-hydroxy-*trans*-resvératrol et dihydroxybibenzyl (appelé lunularine) [100].

Ainsi, les réactions du métabolisme de phase I, de phase II et du métabolisme issu de microbiote peuvent entraîner la formation de nombreux métabolites, allant jusqu'à produire une quinzaine de métabolites différents pour le resvératrol [101–104].

#### 2.4 Transport et distribution des stilbènes

Une fois dans le foie, les molécules, natives ou métabolisées, atteignent la circulation systémique où elles pourront être distribuées dans différents tissus et éliminées par le système urinaire. Dans le plasma, il a été démontré que le resvératrol se liait aux protéines plasmatiques comme l'albumine sanguine (*serum albumin*) afin de circuler pour atteindre les tissus cibles [89,105]. L'administration par voie intraveineuse de resvératrol préalablement lié à l'albumine semble augmenter la concentration plasmatique de ce stilbène [106], montrant ainsi que ce complexe n'accède pas aux tissus et entraîne par conséquent la diminution des concentrations tissulaires de la molécule.

### 3. Pharmacocinétique et biodistribution des stilbènes

De nombreuses études, notamment chez les rongeurs mais également des études cliniques chez l'Homme, ont visé à étudier la biodisponibilité des stilbènes. Les résultats peuvent varier d'une étude à l'autre, et dépendent de l'espèce, du mode d'administration (intra-péritonéal, intra-veineux, voie orale), de la dose administrée, de l'état de jeûne des individus, de la répétition de l'administration, *etc.* De plus, la méthode de quantification des composés et leurs métabolites dans le plasma (et plus généralement dans les tissus) a également un impact sur les résultats des dosages. En effet, la quantification des métabolites glucuronidés est réalisée de différentes façons selon les études : en se basant sur une courbe d'étalonnage de la forme aglycone, par utilisation de glucuronidase pour doser la forme aglycone après hydrolyse, ou en se basant sur la courbe d'étalonnage du métabolite lui-même. Dans ce dernier cas, il faut alors que le métabolite soit commercialisé ou fabriqué en laboratoire.

#### 3.1 Généralités sur la pharmacocinétique

La revue récente de El Khawand *et al.* (2018), fait état des études pharmacocinétiques des stilbènes, en dehors du resvératrol déjà largement étudié [33]. Certains auteurs ont calculé la biodisponibilité des composés, en comparant leurs concentrations plasmatiques après administration par voie intraveineuse et orale. Au-delà de la biodisponibilité, d'autres paramètres pharmacocinétiques permettent de comprendre le devenir d'une molécule après administration. Parmi les paramètres les plus étudiés, on retrouve :

- le  $C_{max}$ , qui est la concentration plasmatique maximale de la molécule ;
- le  $T_{max}$ , qui est le temps que met la molécule à atteindre sa concentration plasmatique maximale ;
- le  $T_{1/2}$ , ou temps de demi-vie, qui est le temps nécessaire à ce que la concentration plasmatique de la molécule diminue de moitié ;



- le Vd, ou volume apparent de distribution, qui représente le volume fictif dans lequel se distribue une quantité de la molécule pour être en équilibre avec la concentration plasmatique ;
- la Cl, ou clairance, qui représente un volume de sang totalement épuré du composé par unité de temps ;
- le lambda Z, ou encore la constante d'élimination, qui représente le temps nécessaire à l'organisme pour éliminer la molécule ;
- le MRT, ou temps de résidence moyen, qui représente le temps d'exposition de l'organisme à la molécule ;
- les AUC, ou aires sous la courbe, qui représentent l'intégrale de la concentration plasmatique sur un intervalle de temps défini (de 0 à l'infini pour AUC<sub>0-∞</sub>, de 0 à la dernière mesure réalisée pour AUC<sub>0-t</sub>).

### 3.2 Etudes pré-cliniques de pharmacocinétique des stilbènes

Plusieurs études pharmacocinétiques ont été réalisées chez l'animal après différents modes d'administration. Concernant le resvératrol, de nombreuses revues scientifiques résument les données bibliographiques de biodisponibilité, de paramètres pharmacocinétiques et de distribution tissulaire de cette molécule [107–109]. La publication scientifique la plus citée à ce jour (plus de 1260 citations) est celle de Walle *et al.* (2004). Cette équipe a administré du resvératrol marqué au carbone 14 chez six humains, par voie orale et intra-veineuse, et a mis en évidence une forte sulfatation et une glucuronidation du resvératrol, ainsi qu'une biodisponibilité du resvératrol qui est nulle [110].

Concernant les autres stilbènes, la plupart des études étant réalisées chez l'animal, nous avons choisi de présenter un résumé des études pré-cliniques chez le rat. Dans le tableau ci-après (tableau 4) sont répertoriées les études réalisées chez le rat après administration par voie orale de stilbènes, d'après la revue de El Khawand *et al.* (2018) [33] et complété par les études récentes.

Tableau 4. Paramètres pharmacocinétiques des stilbènes après administration orale chez le rat. D'après El Khawand *et al.* (2018) [33] DSF = trans-2,6-difluoro-4'-(N,N-diméthylamino)stilbene

Molécule	Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> (nmol/mL)	T <sub>max</sub> (min)	Métabolites	Référence
<b>Picéatannol</b>	22	3,3	15	- 3 méthyl-monoglucuronidés	[111]
	44	7,5	15	-1 méthyl-monosulfate	
	87	8,1	15	- isorhapontigenin - rhapontigenin	
<b>Gnétol</b>	100	-	15	-1 glucuronide	[112]
<b>Oxyresvératrol</b>	180	2,7	10		[113]
	24	1,1	15-240	- glucuronides	[114]
	49	3,1	15-60		[115]
	98	8,6	15-90		
	100	4,0	120		
<b>Pinosylvine</b>	50	0,1	-		[116]
<b>Pinostilbène</b>	50	0,4	15-240		[117]

<b>Pterostilbène</b>	10	0,5	60-120		[118]
	56	11,0	120	-1 glucuronide	[119]
	168	30,7	240		[120]
	15	1,6	90-300	-1 glucuronide	[121]
	30	4,0	120-240	-1 sulfate	
	60	6,4	120-720		
	23	1,5	120		
<b>Picéide</b>	50	0,9	100		[122]
	50	2,7	20	-resvératrol	[123]
	100	3,3	20	-resvératrol-glucuronide	
	300	7,2	30	-picéide-glucuronide	
<b>δ-viniférine</b>	70	0,9	100	-glucuronides -sulfates	[124]
<b>Acide Cajaninstilbène</b>	10	1,3	68		[125]
<b>DFS</b>	10	1,2	30-120	-dé-méthylation -oxidation -défluorination -isomérisation	[126]
<b>Désoxyrhapontigénin</b>	10	1,3	60		[127]
	50	12,6	60		

D'après les données présentées dans ce tableau, il semblerait que les stilbènes subissent bien une forte glucuronidation et sulfatation. La concentration plasmatique, qui varie selon la molécule et la dose administrée, atteint sa valeur maximale entre 15 et 720 minutes après administration. Parmi les monomères, il semblerait que le pterostilbène soit le stilbène retrouvé en plus grande concentration dans le plasma après administration orale.

Les analyses des tissus après administration des stilbènes chez l'animal permettent d'apprécier la biodistribution des composés, autrement dit de déterminer les organes qui semblent accumuler le composé ou ses métabolites. Ainsi, Vitrac *et al.*, ont mis en évidence en 2003 la distribution du resvératrol chez la souris après administration orale du resvératrol marqué au carbone 14. Après 1h30, le composé et/ou ses métabolites (mesure de radioactivité) s'accumulai(en)t dans le duodénum, le foie, les reins puis le colon. Les analyses 3 h après administration révèlent la présence de radioactivité également dans la rate, le cerveau et les testicules [128]. La biodistribution du resvératrol a également été démontrée chez le rat, après administration de la molécule pure ou d'un extrait. En effet, après administration d'un extrait de *Polygonum cuspidatum* contenant du resvératrol, celui-ci a été retrouvé dans l'estomac principalement, suivi de l'intestin, mais également dans les poumons, la rate et le cœur. L'analyse des métabolites après administration orale de cet extrait a montré une accumulation des formes glucuronidées dans le sang, le foie, les poumons et les reins [129,130]. En revanche, une autre étude sur rat a montré que bien que les glucuronides soient majoritaires après administration orale du resvératrol, c'est la forme aglycone qui était retrouvée majoritairement après 18 h dans le foie, les poumons, les reins et le cœur [131]. Le resvératrol a été retrouvé également dans la lymphe de porc [104] ou le thymus de souris [132], montrant ainsi la capacité du composé à rejoindre la circulation lymphatique. Enfin, des études chez le rat et le porc ont montré l'accumulation des métabolites (glucuronidés, sulfatés et issus du métabolisme du microbiote) dans les tissus adipeux [104,133]. L'élimination du resvératrol par les intestins a

également été confirmée, en dosant le resvératrol marqué au H3 dans les fécès [134]. Chez l'homme, les formes glucuronidées du resvératrol ont par ailleurs été retrouvées dans le tissu prostatique [135].

Concernant les autres stilbènes, peu d'études concernant leur distribution tissulaire ont été publiées à ce jour. Le ptérostilbène a été dosé dans les tissus de rats et de souris après administration orale. Chez le rat, ce sont les métabolites sulfatés qui sont majoritaires, et qui atteignent 208 nmol/g de tissu dans le foie, 2 heures après administration de 20 mg/kg pc de la molécule. Dans cette étude, des traces de métabolites glucuronidés ont également été retrouvées dans le foie ; en revanche, c'est la molécule non métabolisée qui était majoritaire dans le cerveau [121]. La forme native a également été mesurée dans l'estomac, les reins, le foie, les intestins et les testicules chez la souris [136]. Enfin, le picéide, monomère glycosidé du resvératrol, a également été administré et retrouvé de manière remarquable dans les ovaires et l'utérus, sous sa forme native, et également sous forme de resvératrol et de resvératrol glucuronidé [137].

Ces études permettent dans un premier temps de mettre en lumière la grande variabilité dans le métabolisme des stilbènes, qui peut être inter-individu, inter-sexe, dose-dépendante et organe-dépendant. Dans un second temps, les données de biodistribution soulignent l'importante accumulation de formes natives et métabolisées dans les organes centraux de la digestion et du métabolisme (intestin, estomac, foie) mais, plus étonnamment encore, dans des tissus périphériques tels que les muscles squelettiques ou tissus adipeux, ou encore dans le système lymphatique et le cerveau.

#### **4. L'ε-viniférine et son métabolisme**

L'état de l'art des études *in vitro* et *in vivo* concernant l'absorption et le métabolisme de l'ε-viniférine est détaillée dans la revue scientifique *In the shadow of resveratrol: biological activities of epsilon-viniferin*, soumis au *Journal of Physiology and Biochemistry* (Springer) (page 35), acceptée avec révisions mineures en octobre 2021.

##### **4.1 Les études *in vitro* sur l'absorption et le métabolisme**

Les études *in vitro* concernant l'absorption et le métabolisme de l'ε-viniférine sont peu nombreuses. En 2015, Willenberg *et al.*, ont étudié l'absorption de l'ε-viniférine en utilisant la lignée cellulaire Caco-2 [138]. Contrairement au resvératrol, l'ε-viniférine ne passe pas la monocouche de cellules Caco-2, et n'est pas détectée dans au niveau basal après une application au niveau apical. Les auteurs ont calculé que seulement 16% d'ε-viniférine sont retrouvés dans ou à la surface des cellules. Concernant l'absence de métabolisme, les auteurs suggèrent que l'ε-viniférine n'est pas un substrat pour les enzymes de phase II se trouvant dans cette lignée [138]. Cette très faible absorption de l'ε-viniférine dans le modèle cellulaire Caco-2 est confirmée par Calvo-Castro *et al.*, en 2018, qui calculent une perméabilité transmembranaire très faible du composé [139].

Concernant le métabolisme de ce dimère, Courtois *et al.* (2017), ont produit les métabolites glucuronidés et sulfatés de l' $\epsilon$ -viniférine par hémisynthèse au sein du laboratoire [140]. Dans ces réactions, le groupement glucuronide ou sulfate est ajouté à une molécule d' $\epsilon$ -viniférine. Les produits des deux réactions d'hémisynthèse contiennent alors chacun 4 isoformes, qui sont ensuite séparés par des techniques de chromatographie comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) semi-préparative et dont la structure a été identifiée par RMN du proton (Figure 11).

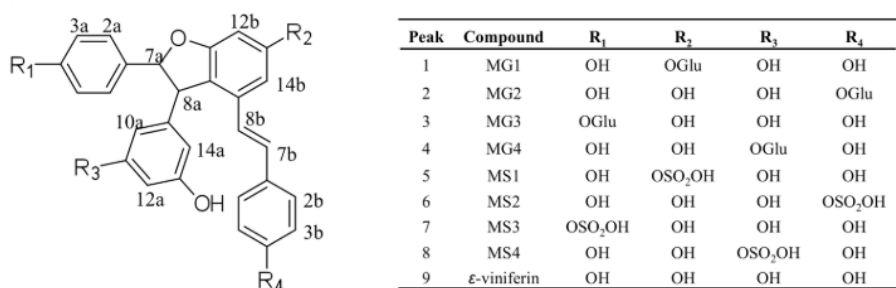


Figure 11. Structure des 4 métabolites glucuronidés et des 4 métabolites sulfatés de l' $\epsilon$ -viniférine [145]

Certains de ces métabolites avaient par ailleurs été observés par Willenberg et ses collaborateurs [141]. En effet, ils avaient mis en évidence une forte glucuronidation de l' $\epsilon$ -viniférine de 85% et 56% en utilisant des microsomes de rat et d'humain, respectivement.

Au laboratoire en 2017, l'utilisation de fractions hépatiques de rat et d'humain, ainsi que des substrats nécessaires à la glucuronidation et la sulfatation (UDP-glucuronic acid, UDPGA et 3'-Phosphoadénosine 5'-phosphosulfate, PAPS), a permis l'identification des 4 isoformes de viniférine-glucuronide et de viniférine-sulfate [140]. Les réactions sont schématisées en Figure 12.

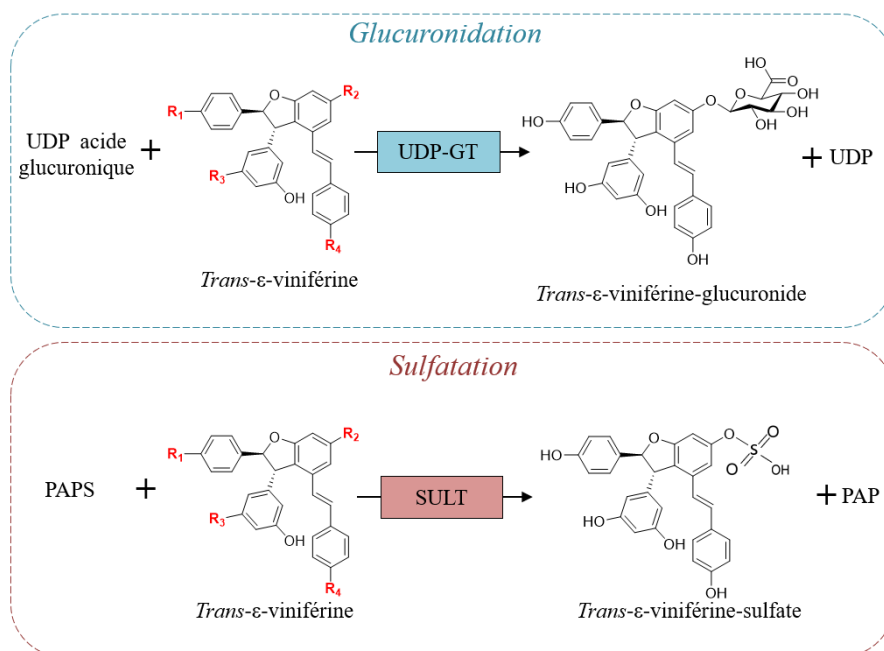


Figure 12. Réactions de glucuronidation et de sulfatation de l'ε-viniférine

UDP : Uridine 5'-diphosphate, UDP-GT : UDP-glucuronosyl-transférase ; PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ; PAP : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphate. Un seul isomère est représenté pour les deux réactions (en R2).

L'utilisation de ces fractions hépatiques a permis de mettre en évidence des variabilités inter-espèce, et notamment la prépondérance de la glucuronidation chez le rat, à la différence des fractions humaines, ces dernières produisant également des sulfates de manière conséquente [140].

#### 4.2 Les études pharmacocinétiques de l' $\epsilon$ -viniférine chez l'animal

A ce jour et à notre connaissance, il n'existe que quatre études disponibles dans la littérature qui mesurent l' $\epsilon$ -viniférine dans le plasma d'animaux après administration.

La première a été publiée en 2017 par Kim *et al.* Dans cette étude, les auteurs ont administré de l' $\epsilon$ -viniférine par voie intraveineuse (IV), intra-péritonéale (IP) et orale, à des concentrations de 2,5, 5 et 10 mg/kg de poids corporel (pc) pour les deux premières voies, et 10 et 40 mg/kg pc pour la voie orale à des souris [142]. Après administration orale, l' $\epsilon$ -viniférine atteint sa concentration plasmatique maximale très rapidement (au bout de 15 minutes) pour une valeur de  $42 \pm 11.9$  ng/mL. Cette équipe a calculé la biodisponibilité de l' $\epsilon$ -viniférine en se basant sur les concentrations plasmatiques retrouvées après administration intraveineuse, et l'ont évaluée à 0.771%. Les auteurs justifient cette très faible biodisponibilité par une faible absorption mais également potentiellement un fort métabolisme, qui n'a pas été étudié dans ce contexte [142].

En 2018, au laboratoire, Courtois *et al.*, ont réalisé une étude *in vivo* après administration IP de 50 mg/kg pc d' $\epsilon$ -viniférine [143]. Ils ont quantifié grâce à l'analyse en chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) couplée à un spectromètre de masse (MS) les métabolites glucuronidés et sulfatés du composé. En sacrifiant les animaux à différents temps, ils ont étudié l'évolution plasmatique mais également tissulaire des concentrations de la forme native et de ses métabolites. Les principaux résultats de cette étude sont présentés en Figure 13. Ces travaux démontrent pour la première fois le métabolisme *in vivo* de l' $\epsilon$ -viniférine. En effet, une forte glucuronidation apparaît 1 heure après administration (pour une  $C_{\max}$  de 8,20 nmol/mL) ainsi qu'une faible sulfatation (0,38 nmol/mL). Concernant la distribution tissulaire, les formes glucuronidées sont très largement présentes dans le foie. On retrouve dans les reins une majorité de formes natives, ce qui est en accord avec la fonction excrétoire de cet organe. Enfin, et de façon plus étonnante, la forme native est majoritaire dans les tissus adipeux bruns (intra-scapulaire) et blancs (épididymaire et rétro-péritonéal).

Cette étude de Courtois *et al.*, met pour la première fois en évidence le métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine chez le rat, et principalement sa glucuronidation [143]. Cette forte glucuronidation a également été observée dans une autre étude chez le rat, au niveau du foie et du plasma, trois heures après le sacrifice d'animaux ayant reçu quotidiennement une dose orale de 252 mg/kg pc d' $\epsilon$ -viniférine (dans des extraits de *Vitis Vinifera* contenant également du resvératrol et de la vitisine B), venant confirmer le fort métabolisme de ce composé [144].

Enfin, Caillaud *et al.* (2019), ont détecté des traces de la molécule aglycone dans le cerveau de souris souffrant de la maladie d'Alzheimer sans pouvoir la quantifier, après administration IP de 10 mg/kg pc d' $\epsilon$ -viniférine. Ces travaux suggèrent alors le passage de ce composé à travers la barrière hémato-encéphalique [145].

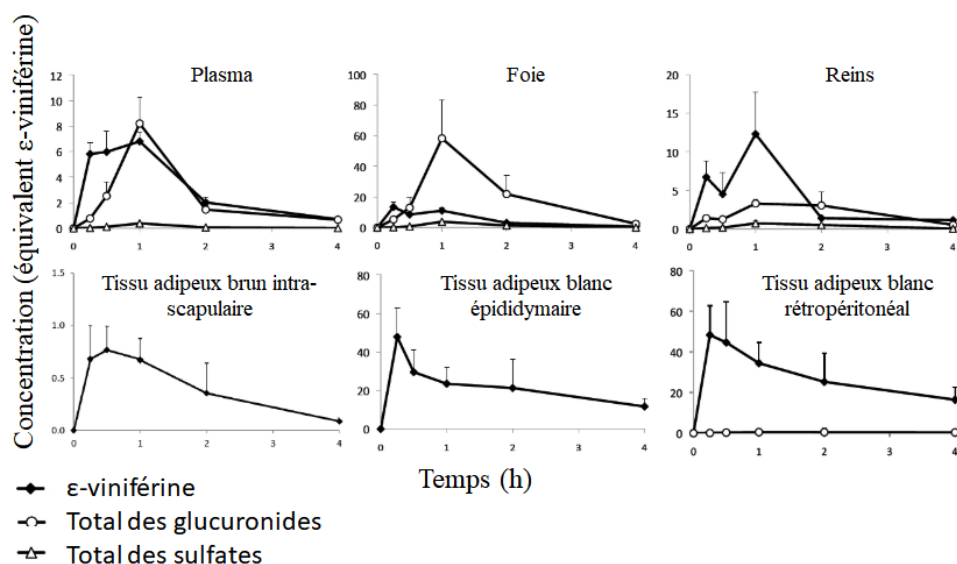


Figure 13. Évolution dans le temps des concentrations plasmatiques et tissulaires de l' $\epsilon$ -viniférine et ses métabolites glucurono- et sulfo-conjugués après administration intra-péritonéale de 50 mg/kg pc d' $\epsilon$ -viniférine chez le rat. Plasma : nmol/mL équivalent  $\epsilon$ -viniférine, tissu : nmol/g équivalent  $\epsilon$ -viniférine. D'après Courtois *et al.*, 2018 [143]

Les stilbènes sont des composés faiblement absorbés et largement métabolisés au sein de l'organisme. De ce fait, de nombreuses études visent à encapsuler ces composés, pour potentiellement améliorer leurs paramètres pharmacocinétiques *in vivo*.

## Chapitre 3. Activités biologiques de l' $\epsilon$ -viniférine

### 1. Revue scientifique sur les propriétés biologiques de l' $\epsilon$ -viniférine

Le resvératrol a été largement étudié ces dernières années pour ses propriétés biologiques. Plusieurs revues font l'état de l'avancée des travaux concernant ce monomère [107,146–148]. Par ailleurs, d'autres stilbènes attirent l'attention des chercheurs, comme le ptérostilbène, l'hydroxyptérostilbène [146] ou le picéatannol [149–151] par exemple. Concernant les dimères du resvératrol, les études sont moins nombreuses. La seule revue scientifique à notre connaissance concernant l' $\epsilon$ -viniférine est celle de Medrano-Padial *et al.*, 2021 [152]. Cette revue fait l'état de l'art des études de cytotoxicité sur modèles cellulaires de l' $\epsilon$ -viniférine, du picéatannol et du ptérostilbène, montrant ainsi les potentielles propriétés anti-cancéreuses de l' $\epsilon$ -viniférine [152]. Cependant, l' $\epsilon$ -viniférine a également été étudiée pour d'autres activités biologiques et a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques.

La synthèse des publications scientifiques relevant des activités biologiques de l' $\epsilon$ -viniférine a fait l'objet d'une revue scientifique récemment acceptée avec révisions mineures au *Journal of Physiology and Biochemistry* et présentée en page 35. Ce dimère du resvératrol a fait l'objet de travaux *in vitro* et *in vivo* qui ont permis de mettre en évidence des propriétés vis-à-vis de pathologies telles que le cancer, les troubles vasculaires, l'obésité et la neurodégénérescence comme le montre la Figure 14. Toutes ses propriétés biologiques sont étroitement liées aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l' $\epsilon$ -viniférine.

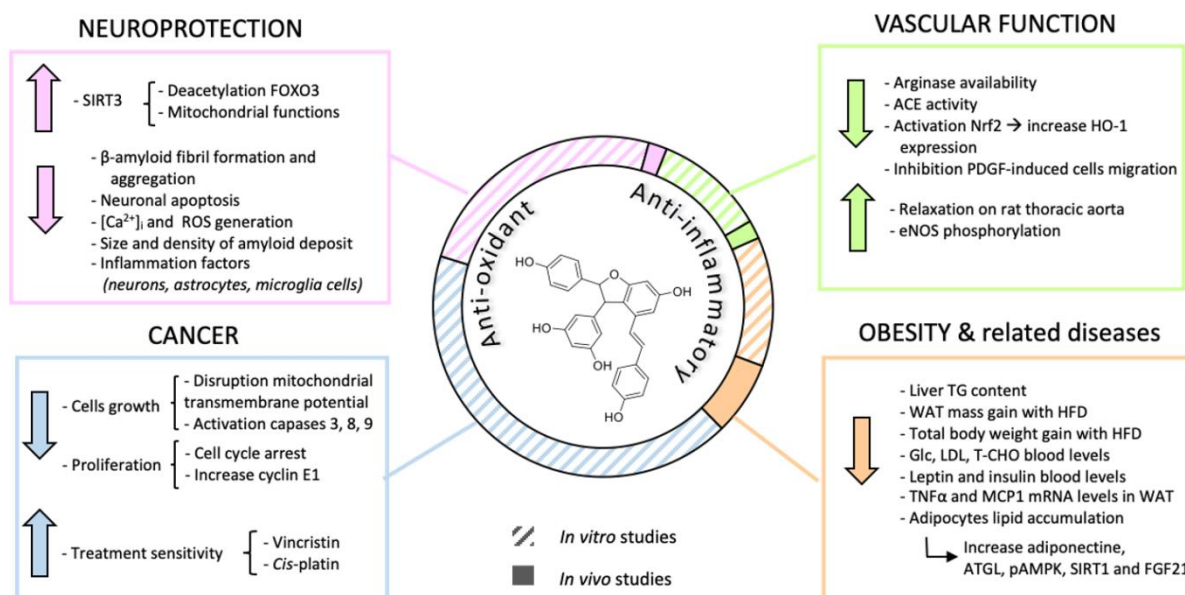


Figure 14. Vue d'ensemble des propriétés biologiques de l' $\epsilon$ -viniférine

Dans le cadre de ces travaux de thèse, des expériences ont été réalisées sur l'inflammation dans des macrophages et l'accumulation de lipides dans des hépatocytes. Ces deux processus étant liés aux maladies du foie gras (NAFLD) et ses complications, la partie 2 de ce chapitre vise à résumer les principaux mécanismes impliqués dans la NAFLD et les propriétés biologiques des stilbènes dans cette pathologie.



# In the shadow of resveratrol: biological activities of epsilon-viniferin

Pauline Beaumont<sup>1,2</sup>, Arnaud Courtois<sup>1,2,3</sup>, Claude Atg <sup>4,5</sup>, Tristan Richard<sup>1,2</sup>, St <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, UR C nologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup> Bordeaux INP, UR C nologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, 33882 Villenave d'Ornon, France ;

<sup>3</sup> Centre Antipoison et de Toxicovigilance de Nouvelle Aquitaine, Bâtiment UNDR, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France ;

<sup>4</sup> Université de Bordeaux, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France ;

<sup>5</sup> Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France ;

\* Correspondence: stephanie.krisa@u-bordeaux.fr; Tel.: +33-(0)5-57-57-59-53

## Abstract

Stilbenes are secondary metabolites belonging to the polyphenol family. Those compounds are derived from the glycosylation, prenylation, methoxylation, hydroxylation or also oligomerization of the well-known *trans*-resveratrol. One of them, *trans*-epsilon-viniferin ( $\epsilon$ -viniferin) is a *trans*-resveratrol dimer that arouses the interest of researchers in the field of human health. The biosynthesis of this molecule in various plant species, particularly high in the Vitaceae family, explains its presence in some red wines, which represent the main source of  $\epsilon$ -viniferin in the human diet. Although bioavailability studies have shown poor absorption and high metabolism of this stilbene, multiple studies demonstrated its biological properties. The  $\epsilon$ -viniferin exhibits strong activities against inflammatory and oxidative stress. Moreover, various studies have reported great activity of this compound in a wide range of disorders and diseases, such as cancer, obesity and its associated disorders, but also in vascular diseases and neurodegeneration, for which the pathophysiology is closely related to the state of oxidation and inflammation. This review provides a state of art of the main activities of  $\epsilon$ -viniferin demonstrated *in vitro* and *in vivo*, highlighting that this resveratrol dimer could be a promising candidate for future functional foods or supplement foods used for the management of many chronic diseases of concern in terms of public health.

### Key Points:

$\epsilon$ -Viniferin is a stilbene present in red wine.

$\epsilon$ -Viniferin has anti-inflammatory and antioxidant activities.

$\epsilon$ -Viniferin could be of interest for human health.

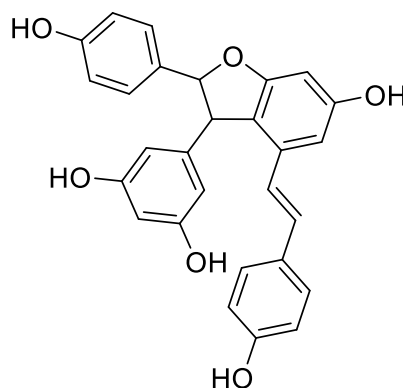
### Keywords:

$\epsilon$ -viniferin, resveratrol dimer, bioavailability, biological activities

## 1. Introduction

Polyphenols are the most abundant secondary metabolites widely dispersed throughout the plant kingdom. As other classes of polyphenols (phenolic acid and flavonoids), the stilbenes family initially derived from the general phenylpropanoid pathway, but their synthesis depends on the stilbene synthase activity which is a pivotal enzyme for their biosynthesis. Their general structures present a C6-C2-C6 backbone with two aromatic rings linked by an ethylene bridge. The main representative of this family is the well-known resveratrol. Apart from resveratrol, the other stilbenes are derived from glycosylation, prenylation, methoxylation, hydroxylation, or oligomerization of two to eight resveratrol units which generate around a hundred compounds (<https://mib-polyphenol.eu/>). In the plant kingdom, these compounds are produced in response to aggressive attacks by pathogens, herbivores or to protect themselves against UV-light damages. Moreover, several studies highlighted their involvement in the inhibition of bacterial or fungal growth. Their biological role seems therefore to be the protection of the plants which can synthesize them, and such compounds are classified as phytoalexins. These observations led to more and more research efforts to use stilbenes as bioactive compounds for pest control, either by spraying stilbenes solution on plants cuticle or by stimulating their production by the plants using elicitors. Stilbenes are also considered as allelochemicals that can inhibit the growth of the neighbouring plants [1].

Besides their usefulness in the plant kingdom, stilbenes, as also many others polyphenols, are implicated in various benefits for human health. Indeed, a huge number of studies reported their anti-inflammatory, anti-oxidant properties which are involved in their reported cardioprotective, anti-diabetic, anti-cancer, neuroprotective and anti-aging activities [2, 3]. Most of the studies were performed using stilbene monomers, resveratrol, pterostilbene, piceatannol as some examples, however, for about fifteen years, several studies have mentioned the potential benefits of oligomers. Among these compounds,  $\epsilon$ -viniferin, which is a major representative among resveratrol dimers (**Figure 1**), is of increasing interest due to its biological activities described in more than one hundred scientific publications. In this review, a brief presentation of  $\epsilon$ -viniferin following by a description of its anti-oxidant and anti-inflammatory effects in addition to its potential beneficial effects as a cardioprotective, neuroprotective, anti-cancerous and anti-obesity agent will be highlighted and discussed.



**Figure 1.** Structure of the *trans*- $\epsilon$ -viniferin. MM: 454.5 Da

## 2. A brief overview about $\epsilon$ -viniferin.

$\epsilon$ -Viniferin has been firstly discovered by Langcake & Pryce in 1977 from grapevine leaves [4]. Its induction was highlighted in grapevine leaves in response to ultraviolet irradiation [5]. This compound is considered the main biogenic precursor of the resveratrol oligomers [6]. The biosynthesis of  $\epsilon$ -viniferin could arise from the oxidative cyclization of resveratrol [4, 5].  $\epsilon$ -Viniferin presents two stereochemical centers, at positions 7a and 8a on the dihydrofuran ring, allowing for four potential stereoisomers, i.e. ( $\pm$ )-*trans*- $\epsilon$ -viniferin and ( $\pm$ )-*cis*- $\epsilon$ -viniferin. The regioselective hemisynthesis of ( $\pm$ )-*trans*- $\epsilon$ -viniferin was described from biomimetic oxidation of resveratrol [6]. The exposition of *trans*- $\epsilon$ -viniferin to UV irradiation induces a rapid isomerization leading to the formation of the *cis*-isomer [4].

It should be kept in mind that several studies dealing with biological activities of  $\epsilon$ -viniferin did not always specify the stereoisomers they used which can lead to some ambiguity. Indeed, there is little information on the isomeric forms of viniferin whether it is of commercial origin or isolated by laboratories. Therefore, it can be assumed that most studies used ( $\pm$ )-*trans*- $\epsilon$ -viniferin. Another potential confusion could reside in the naming of several stilbenes containing the term "viniferin", because behind this generic name several compounds are hidden. Indeed,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, and  $\omega$ -viniferin are resveratrol dimers,  $\alpha$ -viniferin is a resveratrol trimer, and r2-, and r-viniferin are tetramers. Unless specified in the following text of this review, the term  $\epsilon$ -viniferin will be used regardless of the chemical structure of the dimer.

The presence of  $\epsilon$ -viniferin has been highlighted in several plants. Indeed, it was reported that families such as Vitaceae [7–10], Dipterocarpaceae (*Dryobalanops aromatic*, [11]), Paeoniaceae (*Paeonia suffruticosa*, [12]), Iridaceae [13], Gnetaceae [14–16], Gabaceae [17], or Cyperaceae [18, 19] produce stilbene compounds and among them  $\epsilon$ -viniferin. Furthermore,  $\epsilon$ -viniferin could be produced using cell suspension cultures of *Vitis* species [20]. In grapevine,  $\epsilon$ -viniferin is considered as one of the main phytoalexins deriving from resveratrol [21, 22]. Even if it has been observed in leaves and berries [10], the woody parts are considered as the main natural sources of  $\epsilon$ -viniferin [7]. Recent results suggest that wild *Vitis* species present higher  $\epsilon$ -viniferin content in berries [8] and woody parts [9] than the cultivated one *V. vinifera*. In diet, there are several sources of stilbenes consumption which are represented by red wine and grape berries for the main part, whereas other berries such as bilberries, blueberries, cranberries, lingonberries, mulberries and strawberries represent a minor part [23]. For  $\epsilon$ -viniferin, the main dietary source is undoubtedly red wine and the highest concentrations observed were around 1 mg/L [10, 24].

## 3. Bioavailability and metabolism

Bioavailability is the measurement of the rate and the extent of an ingested compound that reaches the systemic circulation and is available at the site of action. Although the study of the biological activities of stilbenes is of growing interest, the bibliographic data show that in general, stilbenes are poorly bioavailable. The study of bioavailability that also includes the biotransformation of  $\epsilon$ -viniferin is necessary to be able to correlate these data with the biological activities measured *in vivo*. El Khawand et al., recently reviewed the bioavailability and pharmacokinetic parameters of stilbene monomers and oligomers structurally related to resveratrol [23]. Among

the oligomeric forms of stilbenes, the absorption and metabolism of  $\epsilon$ -viniferin and an isomer,  $\delta$ -viniferin, have been described.

### ***In vivo bioavailability and distribution studies***

Three studies to date have measured  $\epsilon$ -viniferin concentrations in the plasma of rodents in different experimental conditions. Kim et al., in 2017, compared the effect of increasing doses with different modes of administration in mice [25]. The intravenous route was used, concomitantly with intraperitoneal (2.5, 5 and 10 mg/kg bw) and oral (10 and 40 mg/kg bw) one, in order to calculate bioavailability by a classical determination of the area under the curve (AUC) ratio. Depending of the dose used, after intraperitoneal administration, the bioavailability reaches 93.3, 86.3% and 91.9% with maximum concentrations ( $C_{max}$ ) at  $729 \pm 190$ ,  $1110 \pm 121$  and  $1580 \pm 303$  ng/ml for 2.5, 5 and 10 mg/kg of  $\epsilon$ -viniferin, respectively [25]. The bioavailability after gavage of 10 mg/kg could not be calculated due to plasma concentration values under the limit of quantitation of the analytical method used. After oral administration of 40 mg/kg bw, they determined a maximum concentration of  $42 \pm 11.9$  ng/ml of  $\epsilon$ -viniferin and calculated a bioavailability of 0.771%. This very low oral bioavailability suggests a very low intestinal absorption of the  $\epsilon$ -viniferin and/or could be also justified by a strong intestinal and/or hepatic metabolism. Indeed, a time-to-maximum value ( $T_{max}$ ) of 15 min was determined for  $\epsilon$ -viniferin that highlights a rapid absorption. In this work, plasma metabolites of  $\epsilon$ -viniferin have not been analyzed.

A strong metabolism of  $\epsilon$ -viniferin was demonstrated by Courtois et al. (2018), after intraperitoneal administration of  $\epsilon$ -viniferin in rats (50 mg/kg bw). Indeed, these authors quantified the phase II metabolites (glucuronide and sulfate forms) by LC-HRMS.  $\epsilon$ -Viniferin reached a maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) of 6.8 nmol/ml after an hour ( $T_{max}$ ).  $C_{max}$  of  $\epsilon$ -viniferin-glucuronides and viniferin-sulfates reached 8.20 and 0.38 nmol/ml ( $\epsilon$ -viniferin equivalent) respectively with the same  $T_{max}$  as the native form, i.e; about one hour [26].

In this study, they also investigated the biodistribution of  $\epsilon$ -viniferin and its metabolites in the liver, kidneys, as well as in brown adipose tissue (intrascapular deposit) and two intra-abdominal white adipose tissues (retroperitoneal and epididymal deposits). In the liver, the main organ of phase II metabolism, glucuronides forms are 4 times more present than the native form (58.17 nmol/g equivalent  $\epsilon$ -viniferin versus 13.41 nmol/g  $\epsilon$ -viniferin). On the other hand, the sulfate forms are in lesser quantities. In contrast,  $\epsilon$ -viniferin in its native form has a maximum concentration 3 to 4 times greater in the kidneys than the glucuronides forms, which might be explained by the elimination of the most hydrophobic form. Finally, less than 0.001% of the administered dose was detected in the urine collected 24 h after IP administration ( $\epsilon$ -viniferin and its metabolites), against 9.7% in the feces (24h); suggesting that urinary elimination of conjugated  $\epsilon$ -viniferin metabolites was not the main route. Regarding adipose tissues, interesting results showed an accumulation of the native form in epididymal and retroperitoneal ones, 47.78 and 48.32 nmol/g of tissue respectively, with a relatively slow elimination rate ( $AUC_{0-\infty} > 100$  nmol/g/h) compared to liver (20.70 nmol/g/h) and kidneys (17.53 nmol/g/h) [26]. As an example, the time for which half of the molecule is eliminated is 1.5 to 3 times greater in white adipose tissues than in the liver. Moreover, Medrano-Padial et al. (2021), quantified  $\epsilon$ -viniferin and its glucuronide forms in liver and plasma after three daily oral administrations of stilbenes extract containing 70% of  $\epsilon$ -viniferin (252 mg/kg bw). Three hours after sacrifice, the concentration of glucuronide forms of  $\epsilon$ -viniferin is almost twice the one of  $\epsilon$ -viniferin in the liver (37.9 ng/g and 19.4 ng/g for glucuronides and  $\epsilon$ -viniferin, respectively). In plasma, mean glucuronides forms concentration is 0.9 ng/mL versus 1.9 ng/mL for  $\epsilon$ -viniferin [27]. The stilbenes extract also contained 18% of resveratrol (64.8 mg/kg bw). Resveratrol and its metabolites are found in higher amount than  $\epsilon$ -viniferin and its

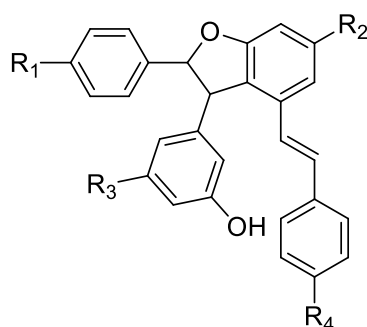
corresponding metabolites, confirming a better bioavailability of the monomer. Interestingly,  $\epsilon$ -viniferin was also detected in mice brain after intraperitoneal injection of 10 mg/kg/week for three months, even if the concentrations found were under the limit of quantification of the analytical method used [28]. The detection of  $\epsilon$ -viniferin in brain suggests its passage through the blood-brain barrier and could explain its *in vivo* neuroprotective activities. The bioavailability of an isomer of  $\epsilon$ -viniferin,  $\delta$ -viniferin, has also been studied *in vivo* in rats. This molecule differs from  $\epsilon$ -viniferin by the position of the ethylene bridge on 2-phenylbenzofuran moiety. Liu and coworkers (2014) administered 10 mg/kg bw intravenously, as well as orally at 20, 40 and 80 mg/kg bw before collecting blood samples at different times [29]. For oral administration, the  $C_{max}$  increased in a dose-dependent manner ( $414 \pm 21$ ,  $779 \pm 25$  and  $1406 \pm 69$  ng/mL for 20, 40 and 80 mg/kg bw, respectively), with the same  $T_{max}$  at 45 min after administration). Compared with the intravenous route,  $\delta$ -viniferin is eliminated more slowly after oral administration:  $T_{1/2}$  of  $29.9 \pm 11.1$  h after oral administration of 80 mg/kg bw against  $T_{1/2}$  of  $4.3 \pm 1.3$  h after intravenous administration of 10 mg/kg bw. In this study, metabolites of the molecule were not analyzed, while Mao et al (2016) used  $\beta$ -glucuronidase and sulfatase in order to distinguish the native  $\delta$ -viniferin from its metabolites [30]. They administered 70 mg/kg bw of  $\delta$ -viniferin orally to one group of rats, and 1.37 mg/kg intravenously to another group. As Liu et al., (2014) they demonstrated a slower elimination of the molecule after oral administration. They demonstrated a strong metabolism of  $\delta$ -viniferin: 7 times more glucuronides and 1.8 times more sulfates production, and assessed the bioavailability of this dimer at 2.3%.

#### ***In vitro* absorption and metabolism (biotransformation) studies**

The capacity of  $\epsilon$ -viniferin to pass through the intestinal barrier was studied *in vitro* on Caco-2 cells, human colorectal adenocarcinoma cells, used as an *in vitro* model of absorption, due to its similarities to the intestinal epithelium. Willenberg et al. (2015) compared the absorption of  $\epsilon$ -viniferin to the one of resveratrol [31]. Caco2 cells were seeded in an insert system, and after the whole differentiation process, the molecules were added in the apical part. Unlike resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin was not detected in the basolateral part after exposure of the cells to 20  $\mu$ M for each molecule (until 6 hours after exposure). On the other hand,  $\epsilon$ -viniferin but not its metabolites are found in the cell lysate. These results indicate that 16% of  $\epsilon$ -viniferin was found in or on the cell surface. The authors suggested that  $\epsilon$ -viniferin was not a substrate for the glucuronosyltransferases and sulfotransferases expressed by Caco-2 cells, which could explain the observed absence of metabolized forms [31]. Calvo-Castro et al. (2018), also tested the transepithelial permeability of  $\epsilon$ -viniferin on Caco-2 cells in order to compare the absorption of a mixture of resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin (from grape vine shoots, Vineatrol®) in micellar solubilization or not [32]. After exposure of the cells, for 1 hour with 25  $\mu$ M of  $\epsilon$ -viniferin, they determined a very low transepithelial permeability of  $\epsilon$ -viniferin ( $6.4 \times 10^{-7}$  cm/s) and efflux of less than 0.3%, results corroborating with those of Willenberg et al (2015).

In addition, Willenberg et al., measured the glucuronidation of  $\epsilon$ -viniferin in contact with human and rat liver microsomes using uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA). For a  $\epsilon$ -viniferin concentration of 10  $\mu$ M, approximately 85% of the substrate was glucuronidated with the rat microsomes, against 56% with the human ones. Although less than resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin undergoes extensive metabolism upon contact with liver fraction [33]. Courtois et al. (2017), calculated kinetic parameters of  $\epsilon$ -viniferin, using human and rat hepatic fractions for different substrate concentrations [34]. Four glucuronide forms and 4 sulfate forms were quantified. Their conformation (positioning of the glucuronide and sulfate groups) was identified by NMR after productions by

hemisynthesis. They demonstrated a predominance of two glucuronide metabolites with one glucuronic acid moiety on the R2 or R3 ring in humans, and one glucuronide metabolite with one glucuronic acid moiety on the R2 ring in rat. Only two sulfated isomers are produced in human liver fraction with one sulfate moiety on the R2 or R4 ring, while all 4 sulfate metabolites are present with the use of rat liver fractions (**Figure 2**). Calculations of  $V_{\max}/K_m$  indicate a glucuronidation 7 times greater than sulfation in rats, and almost equal in humans. This study demonstrated the strong metabolism of  $\epsilon$ -viniferin in glucuronides and sulfates forms *via* hepatic cells [34]. In addition, it shed light on the inter-species differences. *In vitro* studies of absorption on cell lines as well as metabolism using hepatic fractions corroborate with studies of *in vivo*  $\epsilon$ -viniferin bioavailability. This resveratrol dimer showed very low bioavailability, which can be explained by both low intestinal absorption and high metabolism, especially phase II metabolism, namely glucuronidation and sulfation.



**Figure 2.** Structure of the metabolites of  $\epsilon$ -viniferin. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> correspond to the position of OGlu or OS<sub>2</sub>O (Glu= glucuronic acid).

#### 4. Antioxidant and anti-inflammatory activities

Oxidative stress and inflammation are two closely related mechanisms that are associated with the development of many diseases. Oxidative stress results in the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the ability of a biological system to repair the molecular and cellular damages as well as to naturally scavenge ROS.

In the cells, ROS can be naturally produced during the electron transport chain (inner the mitochondrial membrane) necessary for cellular respiration namely the production of ATP from O<sub>2</sub>. ROS can also be produced by endoplasmic reticulum enzymes or by the dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase enzyme. Several external factors can be involved in ROS production, such as smoking, obesity or alcoholism among others. ROS generally have an unpaired electron and are therefore very reactive. The excess ROS causes oxidative damages to various biomolecules such as nucleic acids, amino acids, proteins and lipids. However, to control the level of ROS, biological systems use enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms that allow ROS to be inactivated. Indeed, many enzymes are involved in detoxification processes by neutralizing free radicals. Superoxide dismutase (SOD) regulates superoxide radical levels and the catalase (CAT) enables the dismutation of hydrogen peroxide into oxygen and water. Moreover, glutathione (GSH) reduces hydrogen peroxide, a reaction catalysed by glutathione peroxidase (GPx). This glutathione can also chelate the

Cu<sup>2+</sup> ion, thus preventing ROS production. On the other hand, the antioxidant system consists of compounds able to neutralize ROS and thus protecting the other molecules from oxidation. Thus, oxidative stress that occurs due to the imbalance between ROS production and detoxification, is involved in the acceleration of the normal cellular aging process, but also in the development of numerous diseases like neurodegenerative and cardiovascular diseases, cancers.

Viniferin has also been the subject of some researches, summarized in **table 1**.  $\epsilon$ -Viniferin would therefore have *in vitro* radical scavenging activity reducing free radicals such as ABTS<sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> [21, 35–38]. The lipid peroxidation of rat liver microsomes and the degradation of 2-deoxyribose induced by hydroxyl free radical generated by the Fenton reaction were both inhibited by  $\epsilon$ -viniferin, more efficiently than its monomer [39]. Privat et al. (2002), also measured the antioxidant capacity of  $\epsilon$ -viniferin, and highlighted a decrease in  $\beta$ -carotene oxidation caused by LOO<sup>•</sup> from linoleic acid degradation as well as antioxidant activity against O<sub>2</sub><sup>-</sup> [37]. Yin et al. (2017), formulated hypotheses concerning the mechanism of antioxidant activity of  $\epsilon$ -viniferin, such as a cycloaddition on the double bond of phenol moieties hydroxyl groups [40].

Moreover,  $\epsilon$ -viniferin has demonstrated antioxidant activities on cell models. It improves cell viability on HeLa and PC12 cells after cell damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and  $\beta$ -amyloid peptide, respectively [21, 41]. On hepatocyte carcinoma cell line (HepG2),  $\epsilon$ -viniferin incubation leads to decrease SOD gene expression which is involved in the cellular oxidative stress [42], and also decreases glutathione peroxidase 1 (Gpx1) and ROS detoxification by catalases, suggesting its antioxidant activity in 2,2'-azo bis(2-amidinopropane) (ABAP)-induced free radicals increase in these cells [43].  $\epsilon$ -Viniferin down-regulates genes involved in apoptosis caused by oxidative stress [35, 42]. More recently, Medrano-Padial et al. (2021), showed a decrease in ROS levels and an increase in glutathione levels involved in ROS neutralization in HepG2 and Caco-2 cells after induction of oxidative stress by pre-incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [44]. The radical scavenging activity as well as the down-regulation of oxidative stress marker genes demonstrate the strong antioxidant activity of  $\epsilon$ -viniferin and suggest its potential beneficial effects in many pathologies for which oxidative stress and ROS production are involved.

**Table 1:** Antioxidant activities of  $\epsilon$ -viniferin (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Model	Dose	Effects	Reference
Electron Paramagnetic Resonance, spin trapping of $O_2^-$ generated by $K_2O$	mM range	↓ $O_2^\bullet$ formation ( $IC_{50} = 0.14 \pm 0.02$ mM)	[37]
Coupled oxidation $\beta$ -carotene and linoleic acid	40 $\mu$ M	- $\beta$ -carotene oxidation 39.1%	
2-Deoxyribose assay	0.1-10 $\mu$ M	- 2-deoxyribose degradation ( $IC_{50} = 0.17$ $\mu$ M)	[45]
Rat liver microsome	0.1-10 $\mu$ M	- lipid peroxidation induced by $H_2O_2$	
ABTS	0-200 $\mu$ M	ABTS $^{\bullet+}$ radical ( $IC_{50} = 141$ $\mu$ M)	[36]
Chang Liver cells	0, 50, 100 $\mu$ M	Improve cell viability after oxidative damage induced by $H_2O_2$	[41]
HepG2 cells	80 $\mu$ M	↓ lipid peroxidation level induced by $H_2O_2$ (6 h incubation) ↓ SOD enzyme activity (24 h incubation) ↑ GSH level (3 h, 6 h, 24 h incubation)	[42]
DPPH	$\mu$ M range	DPPH $^\bullet$ reduction ( $IC_{50} = 76.7 \pm 0.55$ $\mu$ M)	[46]
ORAC PC12 cells		Protects oxidation from $ROO^\bullet$ ( $IC_{50} = 98.7 \pm 11.6$ mmol TE/g) Cytotoxicity > 10 $\mu$ M	[47]
HepG2 cells	10-200 $\mu$ g/mL i.e 22 – 440 $\mu$ M	Prevent ABAP-induced ROS formation ( $EC_{50} 75.74 \pm$ $\mu$ g/ml) ↓ SOD gene expression ↓ GPx1 gene expression ↓ catalase involved in ROS detoxification ↓ genes of oxidative stress apoptosis pathways: TIMP1, TIMP2, CASP8, CASP9, FADD, FAS	[43]
ABTS CUPRAC ORAC-FL		-ABTS $^{\bullet+}$ radical ( $10.24 \pm 1.88$ mmol TE/g) $Cu^{2+}$ reducing power ( $4.12 \pm 0.12$ mmol TE/g) Protect oxidation from $ROO^\bullet$ ( $21.85 \pm 0.44$ mmol TE/g)	[38]
Caco-2 cells	$EC_{50}$ , $EC_{50/2}$ , $EC_{50/4}$	↓ ROS levels (14.14 $\mu$ g/mL, 24h and 8.92 $\mu$ g/mL, 48h) ↑ GSH level	[48]
HepG2 cells		↓ ROS levels ↑ GSH level	



Inflammation is a natural organism response to cell and tissue damages or pathogens involving the immune system. Different cell types are involved in the inflammation process, already present in the infection area such as macrophages, mastocytes and dendritic cells (able of phagocytosis), or white blood cells recruited from the systemic circulation. In the infection site, recognition of infection-pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or danger-associated molecular patterns (DAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs) of local sentinel cells triggers the release of chemical inflammation mediators. The main ones are histamine (vasodilator released by mastocytes), prostaglandins (as prostaglandin-E2, PGE2) and different cytokines which allow the recruitment of immune cells from the blood. The triggering of several important signalling pathways is through the recognition of cytokines like interleukins and Tumor-Necrosis-Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by their receptors. They can activate nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), a major inflammatory transcription factor regulating pro-inflammatory cytokines productions, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) for example [49]. Cytokines can also activate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) leading to nitric oxide (NO) production, a pro-inflammatory mediator when it is over-produced [50].

The search for natural anti-inflammatory molecules is increasing with intending to prevent chronic and low-grade inflammation.  $\epsilon$ -Viniferin has anti-inflammatory properties. It has shown *in vitro* activities on enzyme assays by slightly inhibiting the activity of cyclooxygenase 2 (COX-2) enzyme, allowing the production of prostaglandin, a pro-inflammation mediator [51]. This inhibition activity has also been highlighted on human monocytes cell lines and murine macrophages [51, 52]. On human chondrocytes and murine macrophages,  $\epsilon$ -viniferin decreased the levels of PGE2 [52, 53]. Moreover, it decreases NO production after inflammation induction by lipopolysaccharides (LPS) on macrophages and microglial cells [54, 55]. Moreover, Kurundkar et al. (2019), highlighted the central role of a mitochondrial deacetylase, sirtuin 3 (SIRT3), in the inflammatory process after acute lung injury. They showed that  $\epsilon$ -viniferin decreases the expression of genes involved in inflammation mediation through the activity of SIRT3 in macrophages isolated from mice [56] as it is listed in **table 2**.  $\epsilon$ -Viniferin has also an effect on mitochondrial respiration. By upregulating mitochondrial transcription factor A (TFAM), it prevents the mitochondrial reprogramming, proton leakage and decline in dioxygen consumption rate. The same authors performed an *in vivo* experiment, where they administrated by intraperitoneal route 120 mg/kg bw of  $\epsilon$ -viniferin on mice before inducing acute lung injury using lipopolysaccharides (LPS).  $\epsilon$ -Viniferin prevents SIRT3 expression decrease caused by LPS exposure. At the tissue level, it reduces neutrophil flux involved in immune response and reduces the accumulation of debris in alveolar space. Finally,  $\epsilon$ -viniferin decreases the production of inflammatory cytokines listed in **table 2**.

Oxidative stress resulting from over overproduction of ROS and prolonged inflammation are two biological processes involved in the pathogenesis of chronic diseases, cancers or neurodegenerative diseases. In addition to having common biomarkers, they are both closely linked; ROS, by activating inflammasome, induce pro-inflammatory cytokines. Moreover, oxidized protein or peroxidized lipids caused by oxidative stress can become pro-inflammatory molecules [57, 58].  $\epsilon$ -Viniferin has shown antioxidant, antioxidative stress and anti-inflammatory properties; thus, becoming an interesting candidate in maintaining the balance of these processes consequently in the prevention of related diseases.

**Table 2:** Anti-inflammatory activities of  $\epsilon$ -viniferin (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Model	Dose	Effects	Reference
Enzymatic assay	100 $\mu$ g/mL	- COX-1 (99%) - COX-2 (47%)	[59]
Mice with acute liver injury	10 mg/kg bw, intraperitoneal	↓ hepatocellular necrosis ↓ AST activity ↓ ALT activity	[60]
Human chondrocytes	100 $\mu$ M	↓ PGE2 effects	[53]
LPS-activated BV2 microglia	5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M	↓ NO production ( $IC_{50} = 8.6 \pm 0.5 \mu$ M)	[55]
Enzymatic assay	Up to 100 $\mu$ M	↓ Ovine Cox-1 activity ( $IC_{50} = 1.6 \mu$ M) ↓ Human Cox-2 activity ( $IC_{50} = 11 \mu$ M)	[51]
Primary human monocytes	Up to 1 $\mu$ M	↓ COX2 activity (inhibition < 50%)	
Murine macrophages	0.2, 1, 3, 10, 30 $\mu$ M	↓ COX2 mRNA level ↓ PGE2 level ↓ NO production NF-kappaB transitivity	[54]
Mice peritoneal macrophages SIRT3 +/+	1 $\mu$ M	↑ SIRT3 expression ↓ TNF- $\alpha$ production induced by LPS ↓ NLRP3 expression ↓ ATP-linked OCR decline ↓ maximal OCR decline ↓ OCR reserve capacity decline (OCR) ↓ OCR proton leak increase ↑ TFAM expression	[56]
Mouse with endotoxin-induced acute lung injury	120 mg/kg bw, three times, ip	↓ neutrophil flux ↓ debris in alveolar spaces ↓ protein amounts in bronchoalveolar lavage Prevent reduction SIRT3 expression ↓ TNF $\alpha$ and IL-6 ↓ MIP2 ↓ HMGB1 release ↓ DAMPs accumulation ↓ NLRP3 and IL-1 $\beta$ expression	

## 5. Vascular functions

According to the World Health Organization (WHO), the leading causes of death worldwide are represented by ischemic heart disease and stroke, two pathologies that involve the cardiovascular system and represent four out of five cardiovascular diseases. Other cardiovascular pathologies exist such as hypertension, atherosclerosis, or thrombosis that are also leading causes of death. Overall, WHO estimates that around 30% of the worldwide deaths are due to cardiovascular diseases. In the vasculature, the endothelium is located in the innermost part of blood vessels in direct contact with the bloodstream. This monolayer plays a crucial and active role in maintaining vascular homeostasis. In most of the cardiovascular diseases, the physiopathological process involves an endothelial dysfunction that represents the earliest change in the development of the disease. NO is a major vasculo-protective factor derived from the endothelium [61]. NO is produced upon the stimulation of receptors by their respective ligands such as acetylcholine or bradykinin or by shear stress, and derived from the conversion of L-arginine into L-citrulline, which is catalyzed by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS). This vasculo-protective factor produced by the endothelium decreases vascular tone through the stimulation of soluble guanylate cyclase and thus regulates blood pressure, but also could inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and migration, and also could inhibit platelet aggregation. In many cardiovascular diseases, a decrease in the production or bioactivity of NO is often observed and represents a key event in the pathogenesis of many cardiovascular disorders. Inflammation and oxidative stress are two physiological processes that are closely related and play a central role in endothelial dysfunctions [62]

In line with the well-documented effect of polyphenols on the vasculature function and integrity, Mi et al. (2007) demonstrated a relaxing effect of  $\epsilon$ -viniferin on pre-contracted rat thoracic aorta ( $IC_{50} = 18.5 \mu M$ ). From the same study, the authors also tested several other stilbenes and found that the relaxation induced by piceatannol, a resveratrol monomer, is endothelium-dependent and blunted by L-NAME, a NOS inhibitor. These results suggested that the effect of  $\epsilon$ -viniferin, piceatannol and probably the other stilbenes involved, at least in part, an endothelium-dependent NO signaling pathway [63].

By using vascular smooth muscle cells, another study showed that  $\epsilon$ -viniferin presented anti-proliferative effects as well as inhibition of platelet-derived growth factors-induced cell migration probably through a mechanism that involves induction of iNOS and production of NO associated to the inhibition of ROS formation [64]. The authors also demonstrated that  $\epsilon$ -viniferin could induce the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), a well-known antioxidant enzyme, through activation of the Nrf2 transcription factor pathway. The inhibition of HO-1 could prevent vascular muscle cells proliferation. Those results again highlight the involvement of the NO signaling pathway in the antiproliferative and in the inhibition of migration observed effects of  $\epsilon$ -viniferin on vascular smooth muscle cells [64].

It has also been documented that  $\epsilon$ -viniferin can inhibit arginase which limits L-arginine availability for NO production [65]. Activation of NO production by  $\epsilon$ -viniferin is also due to eNOS phosphorylation on Ser1177 residue [66], which can increase phosphorylated eNOS/eNOS ratio and consequently improve healing in endothelial cells [67]. In these endothelial cells, it has also been shown that  $\epsilon$ -viniferin reduces ROS production induced by  $H_2O_2$  and upregulates catalase and GPx activities, both enzymes involved in antioxidant cell activities [67].

On the other part, blood pressure homeostasis is also controlled by vasoconstrictor agents such as endothelin produced by endothelial cells or by the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Located in the kidneys, this system produces among others angiotensin II, a potent vasoconstrictor peptide. Angiotensin II increases arterial blood pressure, through the stimulation of aldosterone and vasopressin secretion, tubular reabsorption of NaCl, or direct vasoconstriction of arterioles. Angiotensin II is derived from angiotensin I, an inactive decapeptide protein, and this reaction is catalyzed by the angiotensin-converting enzyme (ACE). Synthetic ACE inhibitor drugs currently used to control hypertension have many side effects.  $\epsilon$ -Viniferin was shown to inhibit more than 50% of ACE activity and presented an even more powerful inhibitory activity than resveratrol. Nevertheless, this resveratrol dimer was shown to be less effective than the tetramers hopeaphenol and vitisin A. The measurement of docking energies suggests a link between  $\epsilon$ -viniferin and de C-ter of ACE [68].

All the effects of  $\epsilon$ -viniferin on vascular functions are resumed in **table 3**. Many of these effects are mediated by its anti-oxidant properties and also through its activities on the production of the vasodilator NO and the inhibition of the production of vasoconstrictor (ACE).  $\epsilon$ -Viniferin likewise showed *in vivo* activity on spontaneously hypertensive rats by reducing their systolic blood pressure [69].

**Table 3:** Activities of  $\epsilon$ -viniferin in vascular functions (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Model	Dose	Effects	Reference
VSMC from Sprague-Dawley rats thoracic aorta	1-10 $\mu$ M	Relaxation of phenylephrine-induced contraction of aorta (IC <sub>50</sub> = 18.5 $\pm$ 1 $\mu$ M)	[63]
VSMC from Sprague-Dawley rats thoracic aorta	10, 20, 30 $\mu$ M	↓ VSMC number in absence of PDGF - anti-proliferative effect in presence of NO-synthase inhibitor (L-NAME) ↑ iNOS protein level ↓ ROS level + HO-1 expression Nrf2 dependent + accumulation Nrf2 ERK and p38 dependent	[64]
Spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats	5 mg/kg bw, 3 weeks	↓ systolic blood pressure ↓ cardiac mass index	[70]
VEC from porcine pulmonary arteries	10, 20, 30 $\mu$ M	+ healing + eNOS phosphorylation ↓ ROS ↑ catalase and GPx activities	
<i>In vitro</i> ACE inhibitory activity Molegro Virtue Docker	8 $\mu$ M	- ACE > 50% Correlation with C-ter of ACE: -190.4 kJ/mol	[68]
Enzymatic assay	10-100 $\mu$ M	- arginase (>30% at 10 $\mu$ M, >50% at 100 $\mu$ M, IC <sub>50</sub> = 27.8 $\mu$ M)	[65]
HUVEC cells, endothelial cells from human umbilical vein	1-50 $\mu$ M	- VEGF-induced VEGFR-2 phosphorylation (IC <sub>50</sub> = 18.8 $\mu$ M) - VEGF-induced PLCY1 phosphorylation ↑ VEGF-induced akt phosphorylation ↑ peNOS/eNOS ratio	[67]
VEC from porcine aorta cells	5-10 $\mu$ M	+ cell migration into artificial wound through NO production (+ 200% at 10 $\mu$ M) + Ser1177 eNOS phosphorylation ↑ SIRT1 and HO-1 expression ↓ cell viability induced by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ↑ catalase protein levels	[66]

## 6. Obesity and related diseases

According to the WHO, obesity is defined as an abnormal or excessive accumulation of fat that presents a health risk. Patients with a body mass index over 30 are considered obese. Obesity is a major risk factor for numerous chronic diseases, including cardiovascular diseases, metabolic diseases, some types of cancer, or musculoskeletal disorders.

Obesity is characterized at the cellular level by an increase in the number (hyperplasia) and the size (hypertrophy) of adipocytes in adipose tissues. There are two classes of adipose tissues, namely the white adipose tissue (WAT) that accumulates circulating triglycerides in the post-prandial period and releases them by lipolysis during the period of fasting; and the brown adipose tissue (BAT) that oxidizes lipids with the production of heat and participates to the overall thermogenesis. Both adipose tissues mainly contain adipocytes, but also other cell types like endothelial cells and blood cells from the vascular system, macrophages from the immune system and fibroblasts. Excess of adipogenesis is accompanied by an infiltration of macrophages and the production of pro-inflammatory cytokines either by adipocytes or by immune cells. This low-grade inflammation could contribute to the development of obesity-related diseases for which inflammation is present in their pathophysiological processes.

Several authors have evaluated the biological effects of  $\epsilon$ -viniferin on the 3T3-L1 pre-adipocyte cell line (**Table 4**). When they are confluent, these cells are able to differentiate into mature adipocytes under the action of insulin, isobutylmethylxanthine and dexamethasone [71] and are commonly used to study the effects of drugs on the adipogenesis process at the cellular and molecular levels. When added during the differentiation process,  $\epsilon$ -viniferin decreased lipid accumulation in intracellular lipid droplets [72–74], and was more potent than resveratrol [72]. Indeed, resveratrol decreased lipid accumulation from a dose of 50  $\mu$ M, while  $\epsilon$ -viniferin was active from a dose of 25  $\mu$ M. Authors also showed that, in mature adipocytes, exposure to  $\epsilon$ -viniferin for 24 hours resulted in a significant decrease in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression, a key chemokine involved in macrophages recruitment. During the differentiation process,  $\epsilon$ -viniferin also increases adiponectin, adipose triglyceride lipase (ATGL), phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK), sirtuin 1 (SIRT1) and fibroblast growth factor 21 (FGF21) protein expression, all of them involved in lipid metabolism and in the decrease of fatty acid synthase protein expression [74].

**Table 4:** Activities of  $\epsilon$ -viniferin against obesity and related diseases (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Model	Dose	Effects	Reference
Mice with CCl <sub>4</sub> -induced liver lesion	30 mg/kg (intraperitoneal)	+ protection from liver centrilobular necrosis (decrease of 62%) ↓ 60% alanine transaminase	[75]
Enzymatic assay	100 $\mu$ M	- lipoxygenase: $98.2 \pm 3.2$ % ( $IC_{50} = 6.7 \pm 1.9$ $\mu$ M)	[76]
Enzymatic assay		- HMG-CoA: $IC_{50} = 32.6 \pm 30.9$ $\mu$ M	[77]
Porcine small intestines	0.3 mmol/L	↓ increase of $\Delta$ Isc induced by glucose in ileum ↓ Sodium-dependant-D-glucose uptake on brush border membrane vesicles (ileum and jejunum)	[78]
3T3-L1 cell line During differentiation	25, 50 $\mu$ M	↓ relative triglycerides (36% and 72.3% at 25 $\mu$ M and 50 $\mu$ M, respectively) ↓ PPARgamma mRNA (50 $\mu$ M) ↓ MCP-1 mRNA (25 and 50 $\mu$ M)	[79]
Differentiated 3T3-L1 Mice + HFD	50 $\mu$ M 0.2%, 4 weeks	↓ MCP-1 mRNA ↓ body weight gain ↓ white adipose tissue weight ↓ liver triglycerides ↓ leptin and insulin plasma levels ↓ TNF $\alpha$ , MCP-1 and leptin mRNA	
Rat intestinal mucosa	$10^{-4}$ and $10^{-5}$ mol/L	↑ Isc rat cecal mucosal preparation ( $EC_{50} = 4.81 \cdot 10^{-5}$ mol/L), attenuation with (COX)-1 receptor and selective EP <sub>4</sub> prostaglandin receptor ↑ FITC-conjugated dextran permeability ↓ Gt ↓ mucosal sensitivity to short-chain fatty acids	[80]
Enzymatic assay 3T3-L1 cell line Mice	2.5, 5, 10 $\mu$ M, 8 days treatment 10 mg/kg (day 1 to day 38), 25 mg/kg (day 38 to day 58) gavage + HFD	- HMG-CoA reductase activity ( $IC_{50} = 96$ $\mu$ M) ↓ lipid accumulation ↓ body weight gain ↓ mesenteric fat weight ratio ↓ Glc, T-CHO LDL blood levels	[73]

3T3-L1 cell line	5, 10, 15 $\mu$ M 15 $\mu$ M	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ lipid accumulation and triglycerol level</li> <li>↑ adiponectin protein expression</li> <li>↓ PPAR<math>\gamma</math> and FAS protein expression</li> <li>↑ ATGL protein expression</li> <li>↑ p-AMPK protein expression</li> <li>↑ SIRT1 protein expression</li> <li>↑ FGF21 protein expression</li> </ul>	[74]
Enzymatic assay		<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ lipid accumulation blocked with SIRT1 inhibitor</li> <li>- <math>\alpha</math>-glucosidase (IC<sub>50</sub> = 23.98 <math>\pm</math> 1.00 <math>\mu</math>M)</li> <li>- <math>\alpha</math>-amylase (IC<sub>50</sub> = 793.64 <math>\pm</math> 0.18 <math>\mu</math>M)</li> <li>- antiglycation activity (IC<sub>50</sub> = 125.92 <math>\pm</math> 0.53 <math>\mu</math>M)</li> </ul>	[81]
Molecular Docking 3A4A (isomaltase)		Docking score: -20.6144 kcal/mol, interactions between OH and Asp307	
Molecular Docking 3AJ7 (isomaltase)		Docking score: -23.6175 kcal/mol, interaction between phenol ring and His280	
Enzymatic assay Molecular docking	10 mM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 90% inhibition of pancreatic alpha-amylase</li> <li>Involvement of hydroxyl groups</li> </ul>	[82]
Rat with high fat/sucrose diet and induction of diabete	30 or 60 mg/kg bw, 8 weeks	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ FBG level</li> <li>↓ blood glucose level</li> <li>↓ triglycerides serum level</li> <li>↓ TC serum level</li> <li>↓ LDL-C serum level</li> <li>↑ pAMPK level in liver</li> <li>↓ hepatic steatosis and inflammation degrees in liver</li> <li>↓ AST serum level</li> <li>↓ ALT, CR and BUN</li> </ul>	[83]
Molecular docking		Binding with $\alpha$ - and $\beta$ -unit of AMPK	
Molecular dynamics study		Hydrophobic binding and van der Waals binding Activation of AMPK by conformational changes with $\epsilon$ -viniferin binding	



*In vivo*,  $\epsilon$ -viniferin also showed anti-adipogenic properties on mice fed with a high fat diet (HFD). In the study from Ohara et al., mice fed for 4 weeks with 0.2 %  $\epsilon$ -viniferin incorporated in the food, showed an increase of body mass gain lower than those of mice in the control group. In addition, white adipose tissues (subcutaneous, epididymal, mesenteric and retroperitoneal tissues) from treated mice were significantly lighter in comparison with the control group one, despite no difference in livers, kidneys and spleens weights. Animals from groups that received  $\epsilon$ -viniferin presented also a significant decrease in triglycerides accumulation in the liver, and a decrease in leptin and insulin plasma concentrations. Finally, in white adipose tissue, TNF- $\alpha$  and MCP-1 relative mRNA expressions were lower in mice from  $\epsilon$ -viniferin treated mice [79]. Another study confirmed those results in which authors showed that daily oral  $\epsilon$ -viniferin administration to mice contributed to a decrease in body weight gain [73]. Unlike the former results obtained by Ohara et al. (2015), Lu et al. (2017) observed that the decrease was restricted to mesenteric white adipose tissue whereas  $\epsilon$ -viniferin did not exert any effect in white epididymal and perirenal white adipose tissue weights. Blood analysis highlighted a decrease in glucose (Glc), low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol (T-CHO) levels (Lu et al., 2017). In addition,  $\epsilon$ -viniferin exerted inhibitory activities against HMG-CoA and thus may also have hypercholesterolemia regulatory activities [77, 84]. The lowering effect in lipid accumulation in adipocytes, the decrease of white adipose tissue weight and the inhibitory activity against HMG-CoA reductase highlight that  $\epsilon$ -viniferin seems to have anti-adipogenic activities which promote the management of certain metabolic disorders.

Finally, as obesity can lead to insulin resistance that could lead to type II diabetes, the inhibition of enzymes involved in the absorption of glucose allows the reduction of glycemia;  $\epsilon$ -viniferin could therefore have potential anti-diabetic activities.  $\epsilon$ -Viniferin could inhibit *in vitro* the activity of  $\alpha$ -amylase ( $IC_{50} = 793.64 \pm 0.18 \mu\text{M}$ ) and  $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50} = 23.98 \pm 1.00 \mu\text{M}$ ), both enzymes involved in carbohydrates catabolism [81]. Additionally,  $\epsilon$ -viniferin decreased *ex vivo* the sodium-dependent-D-glucose uptake in porcine ileum and jejunum [78]. Liu et al., (2020) have shown *in vivo* improvement of hyperglycemia and hyperlipidemia of  $\epsilon$ -viniferin [83]. They induced type II diabetes on rat with a high fat/sucrose diet and streptozotocin. After 8 weeks of oral administration of  $\epsilon$ -viniferin (30 or 60 mg/kg bw), it was observed a decrease in fasting blood glucose (FBG), triglycerides, total cholesterol and LDL-cholesterol levels in comparison with the control group. In addition,  $\epsilon$ -viniferin seems to protect kidneys and liver function by decreasing hepatic steatosis and inflammation and decreasing key markers of these functions: blood alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransaminase (AST) for hepatic function, and blood creatinine (CR) as well as blood urea nitrogen (BUN) for kidney function. Finally, they highlighted an increase in pAMPK levels and suggested interactions between  $\epsilon$ -viniferin and AMPK by molecular docking study [83]. The effect of this molecule in glucose and lipid metabolism as well as its beneficial physiological improvement in *in vivo* obese animals make  $\epsilon$ -viniferin a promising candidate in the fight against obesity and related diseases.

## 7. Cancer

Cancer is a large group of diseases that can affect any organ or tissue of the body and is characterized by abnormal and uncontrolled cell growth. According to WHO, cancer is the second leading cause of death that accounts for approximately 9.6 million deaths in 2018. The global burden of cancer estimates one out of six deaths is due to cancer. Significant efforts should be made in the field of cancer prevention and treatment. Therefore, studies and

developments of new active compounds, alone or in addition to already used therapies, for the prevention or treatment of cancer are of great interest.

The effect of  $\epsilon$ -viniferin on cancer prevention and treatments has been studied in many cellular models (**Table 5**). Since 2002, more than twenty cancer cell lines have been used: hematologic, nervous, breast, skin, stomach, colonic, liver, lung and bladder cells lines. Studies have shown that  $\epsilon$ -viniferin reduces cell growth in these cancer cell lines and in about half of the cases, the  $IC_{50}$  observed are less than 50  $\mu$ M. In addition, a comparison of the activities of  $\epsilon$ -viniferin with those of resveratrol showed that the dimer is more active than resveratrol in a third of cases.

In some studies,  $\epsilon$ -viniferin mechanisms of action on cytotoxic and anti-proliferative activities have been investigated, and most of them are linked to apoptosis. This form of programmed cell death is essential for the development and tissue homeostasis of organisms. Apoptosis can be initiated through two major mechanisms, the intrinsic (mitochondria-mediated) and the extrinsic (death receptor) pathways. In the intrinsic one, the majority of pro-apoptotic stimuli are associated with the permeabilization of the outer mitochondrial membrane. This process is regulated by a balance of pro- and anti-apoptotic members of the B-cell lymphoma 2 family (Bcl-2) and leads to cytochrome C release into the cytosol. This apoptotic factor allows the activation of caspases, proteases responsible for the apoptotic phenotype [85].  $\epsilon$ -Viniferin has been shown to induce apoptotic cell death in several cancer cell lines, including leukemic [86], myeloma-derived, glioma [87], skin malignant melanoma cancer [88] and hepatocellular carcinoma cell lines [89, 90]. It has been demonstrated that  $\epsilon$ -viniferin induces apoptosis *via* the disruption of normal mitochondrial transmembrane potential and the activation of proapoptotic proteases. Indeed, the activation of caspase 3 was observed in leukemic cells [86] and hepatocellular carcinoma cells [42]. Barjot et al., (2007) demonstrated that caspase-8 activation by  $\epsilon$ -viniferin mediates an important part of the cytotoxic effect of this compound on the U266 myeloma cell line [87]. In C6 glioma cells, the activation of caspase-8, -9, -3 was also demonstrated [91].

The anti-proliferative effect could be also associated with disruption of the cell cycle. The ability of  $\epsilon$ -viniferin to induce cell cycle arrest has been investigated. Barjot et al., (2007) observed that  $\epsilon$ -viniferin treatment led to an accumulation of U266 myeloma cells in G2-M phases and a reduction of cells in G0/G1 phases [87]. Moreover, it was demonstrated that  $\epsilon$ -viniferin arrests the cell cycle of melanoma cells in S phase and decreases the percentage of cells in G1 phase by inducing an increase in a key regulator protein that controls the cell cycle progression through S phase, such as cyclins E1 [88].

Besides  $\epsilon$ -viniferin, other oligomers of resveratrol have been studied for their anti-cancer activities *in vitro*. The highlighted cytotoxic activities were very different depending on the cell lines used and the structures of the oligomers. Ito et al., (2003) studied the effects of 18 oligomers (from dimers to octamers) on 5 human tumor cell lines [92]. Among them, the seven compounds that displayed marked cytotoxicity effects are mainly oligomers with more than four basic resveratrol units. Other authors did not observe such a tendency and have shown that the number of resveratrol units doesn't influence the cytotoxic activity [93–95]. In addition, even though large molecules are the most active, we can assume that their efficacy might be limited by their potential low bioavailability in *in vivo* studies. Unfortunately, by opposite to resveratrol, no *in vivo* experiment was performed to study the potential beneficial effect of  $\epsilon$ -viniferin on cancer promotion, progression or treatment.

In several studies,  $\epsilon$ -viniferin itself was not used alone but within a plant extract or a combination of compounds. Those studies have shown that those mixtures or combinations are sometimes more active than the molecule alone,

thus indicating possible synergistic effects. As an example, Vineatrol®, showed more efficient antiproliferative effects than resveratrol or  $\epsilon$ -viniferin alone in leukemic and hepatoma cells [86, 96]. Likewise, the combination of  $\epsilon$ -viniferin with anti-cancer drugs, such as vincristine or *cis*-platin, was investigated. Özdemir et al., (2014) showed that  $\epsilon$ -viniferin promotes the sensitivity of cells against vincristine treatment on HepG2 cells [89]. The same author also demonstrated a strong apoptotic effect of the combination of *cis*-platin and  $\epsilon$ -viniferin. So, the  $\epsilon$ -viniferin could be used in a combined treatment strategy with multiple anti-cancer drugs to decrease drug resistance and to reduce the dose of anti-cancer drugs and thus to limit their side effects.

Very interesting results were obtained by Nivellet et al. (2018) who observed slight toxicity for  $\epsilon$ -viniferin on normal cells (normal fibroblasts) compared to cancer cell lines (melanoma cancer cells) [88]. Moreover, in HH4 non-transformed hepatocytes, much higher concentrations of the stilbene dimer were needed to induce toxicity than in hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2 and Hep3B [97].

Finally, most of the studies have shown that  $\epsilon$ -viniferin is able to decrease cancer cell growth, induce apoptosis and modify the cell cycle. Moreover, the harmlessness of stilbenes on normal cells compared to cancer cell lines is very promising for a potential use of these compounds in cancer management.

**Table 5:** Anticancer activities of  $\epsilon$ -viniferin (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Model	Doses/IC <sub>50</sub>	Effects	Reference
C6 mouse glioma cancer cells	IC <sub>50</sub> = 18.4 $\mu$ M	Cytotoxic activity	[98]
Hela human cervix adenocarcinoma cells, MCF-7, human breast adenocarcinoma cells HepG2 human hepatocellular carcinoma cells HT-29 human colon adenocarcinoma cells	IC <sub>50</sub> = 20.4 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 44.8 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 74.3 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 88.4 $\mu$ M		
WSU-CLL, an EBV-negative cell line derived from a B-CLL patient resistant to fludarabine treatment	IC <sub>50</sub> > = 60 $\mu$ M	Antiproliferative activity Apoptosis induction Dissipation of the transmembrane mitochondrial potential Activation of caspase 3	[86]
ESKOL cells were derived from a patient with hairy cell leukemia (HCL)	IC <sub>50</sub> = about 50 $\mu$ M	Antiproliferative activity Apoptosis induction	
HL60, leukemia cancer cells	IC <sub>50</sub> = 44.2 $\mu$ M	Cytotoxic activity	[92]
HL60, leukemia cancer cells	IC <sub>50</sub> = 33 $\mu$ M	Cytotoxic activity DNA fragmentation	[99]
P-388 murine leukemia cells	IC <sub>50</sub> = 18.1 $\mu$ M	Cytotoxic activity	[93]
U937 histocytic lymphoma-derived promonocytic cells	IC <sub>50</sub> = 20.4 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 39.3 $\mu$ M	Antiproliferative activity	[87]
K562 chronic myelogenous leukemia-derived myeloid cells	IC <sub>50</sub> = 45.7 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 83.5 $\mu$ M		
RPMI-8226 myeloma-derived cells	IC <sub>50</sub> = 30.8 $\mu$ M	Antiproliferative activity	
Jurkat acute T cell leukemia-derived lymphoid cells		Accumulation of cells in the G2/M phase ↑ apoptosis	
U266 myeloma-derived cells		↑ caspase-8 activation Disruption of mitochondrial membrane potential	
HepG2 human hepatoma cells	IC <sub>50</sub> = 58,4 $\mu$ M	Cytotoxic activity	[96]
SW480 human colon carcinoma cell	30, 60 and 100 $\mu$ M	Very slight antiproliferative activity	[100]
MCF-7 human breast cancer cells	IC <sub>50</sub> = 99 $\mu$ M	Antiproliferative activity	[101]
HT-29 colon carcinoma cells	IC <sub>50</sub> = 143 $\mu$ M		

U87-MG CNS glioma cells	IC <sub>50</sub> = 59 μM		
U373-MG CNS glioma cells	IC <sub>50</sub> = 17 μM		
tamoxifen-resistant MCF-7 breast cells	10 μM	↓ VEGF production	[102]
HL-60 human promyelocytic leukemia cells	IC <sub>50</sub> = 9.0 μM	Cytotoxic activity	[94]
HeLa human cervical cells	IC <sub>50</sub> = 17.1 μM		
MCF-7 human breast adenocarcinoma cancer cell lines	IC <sub>50</sub> > 30 μM		
A431 human epidermoid carcinoma cell line	≥ 27 μg/mL	Antiproliferative effects	[103]
Enzymatic activity	45 μg/mL	- catalytic activity of topoisomerase II	
Enzymatic activity	IC <sub>50</sub> = 4.1 μM	↓ tyrosinase activity	[104]
HepG2 human hepatoma cells	IC <sub>50</sub> = 98.3 μM	Cytotoxic activity	[89]
		Morphological changes (increased lipid production in the cell and irregularities in the structure of chromatin)	
		Apoptosis induction	
A549 human lung adenocarcinoma epithelial	IC <sub>50</sub> = 99.12 μM	Cytotoxic activity	[95]
MCF-7 human adenocarcinoma breast cancer cell line	IC <sub>50</sub> = 89.70 μM		
HepG2 human hepatoma cells	98.3 μM	Depolarization of mitochondrial transmembrane potential	[90]
		DNA Fragmentation	
		↑ caspase-3 activity	
HT-144 human skin malignant melanoma cancer cells	IC <sub>50</sub> = 82.31 μM	Cell viability inhibition	[105]
SKMEL-28 human skin malignant melanoma cancer cells	IC <sub>50</sub> = 86.62 μM		
HDF human normal fibroblasts	IC <sub>50</sub> = 91.94 μM		
HT-144 human skin malignant melanoma cancer cells	IC <sub>50</sub> = 60 μM	- cell viability	[88]
		↑ necrosis	
		↑ mitochondrial O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
		Accumulation of the cells in the S phase and a decrease in G1 phase (treatment for 72h)	
		↑ cyclin A and E1 expressions	

SKMEL-28 human skin malignant melanoma cancer cells	IC <sub>50</sub> = 85 μM	Cell viability inhibition ↑ necrosis Proapoptotic effect ↑ mitochondrial O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Accumulation of the cells in the S phase and a decrease in G1 phase (treatment for 72h) ↑ cyclin A expression (treatment for 24h) Slight disruption of the cell cycle progression	
HDF human normal fibroblasts			
C6 glioma cells	95, 130 μM	Antiproliferative activity Depolarization of mitochondrial transmembrane potential ↑ apoptotic index DNA Fragmentation ↑ caspase -3, -8, -9 activities	[91]
MRC-5 normal lung fibroblasts	IC <sub>50</sub> = 49.9 μM	Antiproliferative activity	[38]
AGS gastric adenocarcinoma cells	IC <sub>50</sub> = 42.6 μM		
SK-MES-1 lung cancer cells	IC <sub>50</sub> = 78.8 μM		
J82 bladder carcinoma cells	IC <sub>50</sub> = 56.7 μM		
HepG2 human hepatoma cell line	IC <sub>50</sub> = 140.0 μM	Cytotoxic activity	[97]
Hep3B human hepatoma cell line	IC <sub>50</sub> = 108.1 μM		
HH4 non-transformed Human hepatocyte cell line	IC <sub>50</sub> > 200 μM		

## 8. Neurodegenerative diseases

The nervous system is an essential part of the body's communication system. This extremely complex system is vulnerable to various diseases and traumas related to neuronal degeneration (Alzheimer's disease, Huntington's chorea or Parkinson's disease), immune system dysfunction (multiple sclerosis), obstruction of an artery (stroke), trauma or tumors that can lead to anatomical and functional brain damages. The major pathological mechanisms of brain diseases include abnormal protein aggregation, oxidative stress, inflammation, and apoptosis. Since 2006, studies, mainly using *in vitro* models, were performed to demonstrate the effect of  $\epsilon$ -viniferin on these mechanisms. Oxidative stress has been implicated in the progression of various neurodegenerative diseases. Several authors have thus studied the effect of  $\epsilon$ -viniferin on ROS generation and oxidative stress [12, 98–101], and more particularly on SIRT3, which regulates the damages caused by oxidative stress and restores mitochondrial functions, such as maintaining basal ATP levels, regulating apoptosis and energy homeostasis. Fu et al., (2012) showed that  $\epsilon$ -viniferin was the most potent compound, among 22 stilbenes, which exhibited consistent cytoprotection in different cell models of Huntington disease. In striatal cells expressing mutant Htt (huntingtin protein), the addition of  $\epsilon$ -viniferin prevented mitochondrial dysfunction, promoted mitochondrial biogenesis and enhanced anti-oxidant activity *via* an increase of SIRT3 protein and activation of AMP-activated Protein Kinase (AMPK)[100]. Moreover, Naia et al., (2021) studied the effect of  $\epsilon$ -viniferin on mitochondrial morphology and movement in primary striatal neurons. They showed that the induction of SIRT3 expression by  $\epsilon$ -viniferin reestablishes mitochondrial neuritic elongation and trafficking in neurons [102]. In another study using SH-SY5Y cells treated with rotenone as a cellular model of Parkinson's disease,  $\epsilon$ -viniferin promoted the deacetylation of FOXO3 mediated by SIRT3. This SIRT3/FOXO3 activation reduces oxidative stress, and maintains mitochondrial homeostasis, thus resulting in inhibition of rotenone-induced cell apoptosis [101]. In these three studies, SIRT3 is required for the neuroprotective effect of  $\epsilon$ -viniferin.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, whose main characteristics are accumulation and aggregation of extracellular amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ). The biological effects of  $\epsilon$ -viniferin on this pathology have been the subject of numerous studies *in vitro* (**Table 6**). The effects of  $\epsilon$ -viniferin and other resveratrol derivatives (monomers and oligomers) have been evaluated on A $\beta$  aggregation using an *in vitro* assay based on UV-visible measurements and the A $\beta$ (25-35) peptide fragment [103–105].  $\epsilon$ -Viniferin presented a weak inhibition of A $\beta$  fibril formation (27%) compared to other dimers (between 39% and 93%) and  $\epsilon$ -viniferin glucoside (93%), while Vion et al., (2018) showed that  $\epsilon$ -viniferin is able to induce disaggregation of aggregated full-length A $\beta$ 42 peptide [106]. Moreover,  $\epsilon$ -viniferin reduced the A $\beta$ (25-35)-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase and ROS generation and, as a result, attenuated neuronal apoptotic death in primary cultures of rat cortical neurons [98]. It also reversed A $\beta$ (25-35)-induced death of rat pheochromocytoma cells [21]. However,  $\epsilon$ -viniferin had a moderate effect on the secretion of endogenous A $\beta$ 42 from SH-SY5Y cells and no effect on the viability of human neuroblastoma cells treated with A $\beta$ 42 [107].

Models of neurons and astrocytes co-culture [106] or neurons and microglial cells co-culture [108] were used to evaluate the effects of  $\epsilon$ -viniferin on Alzheimer's or Parkinson's diseases, respectively. In both studies, a decrease in the production of inflammatory factors was observed. Sergi et al., (2021) have also shown that  $\epsilon$ -viniferin protected neuronal dopaminergic cells from 6-OHDA-induced cytotoxicity and apoptosis [108]. Caillaud et al., (2019) evaluated, in transgenic APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup> mice, the effects of  $\epsilon$ -viniferin (10 mg/kg bw) weekly

intraperitoneal injection from 3 to 6 months of age. The dimer reduced size and density of amyloid deposits in the brain and decreased the first activation of cellular inflammatory actors, like astrocytes and microglia [28]. Finally, it can be summarized that the neuroprotective activities elicited by  $\epsilon$ -viniferin could be explained by the prevention of oxidative stress, inflammation, apoptosis and abnormal protein aggregation.



**Table 6:** Neuroprotective activities of  $\epsilon$ -viniferin (+: induction, -: inhibition, ↓: decrease, ↑: increase)

Models	Doses/IC <sub>50</sub>	Effects	References
25–35 A $\beta$ aggregation <i>in vitro</i>	10 $\mu$ M	↓ amyloid fibril formation (27%)	[111–113]
Primary cortical neuron cultures	0.3, 1, 3 $\mu$ M	↓ A $\beta$ (25-35)-induced neuronal death ↓ A $\beta$ (25-35)-induced neuronal apoptotic death - A $\beta$ (25-35)-induced intracellular [Ca <sup>2+</sup> ] elevation ↓ A $\beta$ (25-35)-induced ROS generation	[106]
Primary cortical neuron cultures	0.5, 1, 5 $\mu$ M	↓ glutamate-induced neuronal death Blocked the glutamate-induced decrease of Bcl-2 and increase of BAX expression - glutamate-induced intracellular [Ca <sup>2+</sup> ] elevation ↓ glutamate-induced ROS generation	[107]
Immortalized striatal precursor cells mutant Htt PC12 cells mutant Htt Neuroblastoma N2a cells mutant Htt Primary cortical neurons mutant Htt Immortalized striatal precursor cells mutant Htt	10 nM-1 $\mu$ M   1 $\mu$ M	+ protection against mutant Htt-induced cell toxicity   ↓ intracellular accumulation of ROS ↑ loss of mitochondrial potential ↑ intracellular NAD <sup>+</sup> /NADH ratio ↑ number of mitochondrial DNA copies ↓ PGC-1 $\alpha$ depletion ↑ SIRT3-dependent AMPK Activation ↑ levels of SIRT3 protein and its deacetylase activity	[108]
GABA <sub>A</sub> receptor subtypes expressed in <i>Xenopus laevis</i> oocytes	1-300 $\mu$ M	Negative modulation the GABA-induced current at all three subtypes	[117]
ORAC PC12 cells	10 $\mu$ M	High antioxidant activity ↓ A $\beta$ (25-35)-induced neuronal death	[21]
SH-SY5Y cells	10, 20 $\mu$ M	Moderately ↓ A $\beta$ 42 production Moderately ↑ the expressions of TACE, IDE and ECE1	[115]

Murine primary co-culture of cortical and hippocampal neurons and astrocytes	1 $\mu$ M	+ disaggregation of previously aggregated A $\beta$ 42 peptide ↓ release of TNF $\alpha$ and IL-6 by cells treated with A $\beta$ 42 and IL-1 $\beta$	[114]
Transgenic APPswePS1dE9 mice	a weekly IP at 10 mg/kg from 3 until 6 months of age	↓ the amyloid fibrillary deposits in cortex and hippocampus ↓ GFAP signal in cortex ↓ IBA-1 signal in cortex and hippocampus	[28]
Cholinesterase inhibitory assay	IC <sub>50</sub> = 24.54 $\mu$ M	- acetylcholinesterase activity	[12]
PC12 cells	IC <sub>50</sub> = 213.63 $\mu$ M 0.1, 1, 10 $\mu$ M	- butyrylcholinesterase activity ↑ viability of PC12 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation	
Primary neurons isolated from YAC128 mice embryos	1 $\mu$ M	↑ mSIRT3 protein and mRNA level Prevention of mitochondria fragmentation ↓ percentage of stationary mitochondria Reestablishment of mitochondrial velocity	[110]
Nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells	10 nM	↓ 6-OHDA-induced cytotoxicity ↓ 6-OHDA-induced DNA fragmentation ↓ number of 6-OHDA-induced apoptotic cells ↓ cleavage of 6-OHDA-induced caspase-3 and PARP-1	[116]
N9 microglia and neuronal PC12 cell co-culture system	10 nM	↓ cytotoxicity promoted by LPS-activated N9 microglia cells ↓ release of TNF $\alpha$ and IL-1 $\alpha$ by cells treated with LPS	
SH-SY5Y human neuroblastoma cells	50 nM-10 $\mu$ M 1 $\mu$ M	↑ viability of SH-SY5Y cells against rotenone-induced neurotoxicity ↓ rotenone-induced mitochondrial depolarization ↓ rotenone-induced intracellular accumulation of ROS ↑ ATP production in rotenone-treated SH-SY5Y cells ↓ rotenone-induced apoptosis + SIRT3-mediated FOXO3 deacetylation and nuclear localization + the expression of mitochondrial homeostasis-related proteins	[109]

## 9. Conclusion

Stilbenes represent a large family of natural products that are formed from the glycosylation, prenylation, methoxylation, hydroxylation, or oligomerization of resveratrol, the well-known and highly studied stilbene. Those compounds are mainly produced by *Vitis* genus and endowed with several biological activities. Among them,  $\epsilon$ -viniferin is a resveratrol dimer that was the focus of this review. The anti-oxidant as well as the anti-inflammatory properties of  $\epsilon$ -viniferin were described at the central part of many of the studies during the last fifteen years. Sometimes its biological properties are even greater than those of resveratrol itself. In line with this, we have listed here the results showing the beneficial properties of  $\epsilon$ -viniferin in *in vivo* or *in vitro* models of cancers, obesity, obesity-related disorders, cardiovascular or neurodegenerative diseases. In this way, we highlight that this molecule acts on different mechanisms that are specific or common to several diseases (**Figure 3**). In order to consolidate these results, it is now essential to carry out *in vivo* studies which are still too rare. This low number of animal experiments could be explained by the high cost of purchasing a large quantity of this compound. Therefore, laboratories that have the skills and technologies to isolate and purify  $\epsilon$ -viniferin in large quantity have an advantage over others to perform such *in vivo* studies.

Even though the beneficial activities of  $\epsilon$ -viniferin are indisputable, some concerns remain regarding its extrapolation to clinical trials. Indeed, a concern deals with the poor bioavailability and the extensive metabolism by phase-II metabolizing enzymes of  $\epsilon$ -viniferin, which could contribute to lower the concentrations of the native compounds in Human. The beneficial effects after *in vivo* administration, for anti-obesity activities for instance, now raise the question of the potential activities of  $\epsilon$ -viniferin metabolites. To identify these metabolites, and to confirm and describe their effects, many researches are needed. However, the metabolites of  $\epsilon$ -viniferin are not commercially available and have so far only been obtained by hemi-synthesis [34].

It is also interesting to note that several authors have used a plant extract instead of  $\epsilon$ -viniferin alone and found an effective activity of the extract. This raises the question of the synergistic action between compounds that are contained in the extract and maybe the synergy between  $\epsilon$ -viniferin and many other polyphenols. The identification of this potential synergistic activity deserves further investigations that will be very complex to study especially because of the complexity of the plant extracts. In addition, it has been shown that this dimer, when used in combination with drugs, plays an important role in improving chemotherapeutic potential.

It was also shown that  $\epsilon$ -viniferin possesses some antibacterial activities against gram (+) or gram (-) bacteria such as *Streptococcus* and *Staphylococcus*, or *Pseudomonas* and *Escherichia* genus, respectively [109–113].  $\epsilon$ -Viniferin exerts its activities by reducing bacterial cell growth, and by inhibiting biofilm formation. Its inhibitory activities are of particular interest in *Staphylococcus aureus* resistance to methicillin, and could make  $\epsilon$ -viniferin a new candidate to enlarge and substitute the classical therapeutic arsenal of antibiotics. Moreover,  $\epsilon$ -viniferin could be advantageous as a food additive for the management of food contamination for its promising activity similar to classical conservatives used in the food industry. In some studies,  $\epsilon$ -viniferin was found to be more effective than other stilbenes such as resveratrol or ampelopsin [109].

Finally, an interesting review resumed some toxicological evaluations of piceatannol, pterostilbene and  $\epsilon$ -viniferin [114], and especially their cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects. The authors stated that although the toxicity of all of those stilbenes was extensively studied in normal or cancer cell lines, the toxicological evaluation according to EFSA guidelines for a new ingredient or food supplement allowed for a placing in human food was

not performed [115]. Moreover, no *in vivo* toxicological study with  $\epsilon$ -viniferin alone exists for the moment. Therefore, like others, we consider this is a point to improve to guarantee a harmless use of this stilbene. Indeed, we believe  $\epsilon$ -viniferin belongs to the new promising natural compounds that could be used to perform functional foods or supplement foods for the control and prevention of oxidative stress- and low-grade inflammation-triggered diseases.

## Compliance with Ethical Standards

Funding: No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.

Disclosure of potential conflicts of interest: the authors declare no conflict of interest

Research involving Human Participants and/or Animals: none

Informed consent: none

Authors Contribution: All authors contributed to the study conception. The literature search was performed by Pauline Beaumont, data analysis was performed by Pauline Beaumont, Arnaud Courtois, and Stéphanie Krisa. The work was drafted by Pauline Beaumont, Arnaud Courtois, Tristan Richard and Stéphanie Krisa and critically revised by Claude Atgié. The authors declare that all data were generated in-house and that no paper mill was used.

## References

1. Chong J, Poutaraud A, Huguency P (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177:143–155
2. Cory H, Passarelli S, Szeto J, et al (2018) The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* 5
3. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26:1001–1043. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
4. Langcake P, Pryce RJ (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33:151–152. <https://doi.org/10.1007/BF02124034>
5. Langcake P, Pryce RJ (1977) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16:1193–1196. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94358-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94358-9)
6. Liu M, Dong T, Guan X, et al (2018) Regioselective biomimetic oxidation of halogenated resveratrol for the synthesis of ( $\pm$ )- $\epsilon$ -viniferin and its analogues. *Tetrahedron* 74:4013–4019. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.06.005>
7. Gabaston J, Leborgne C, Waffo-Teguo P, et al (2019) Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: A comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* 30:320–331. <https://doi.org/10.1002/pca.2815>
8. Gabaston J, Valls Fonayet J, Franc C, et al (2020) Characterization of Stilbene Composition in Grape Berries from Wild *Vitis* Species in Year-To-Year Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:13408–13417. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04907>

9. Loupiti G, Prigent S, Franc C, et al (2020) Polyphenol Profiles of Just Pruned Grapevine Canes from Wild *Vitis* Accessions and *Vitis vinifera* Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:13397–13407. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08099>
10. Benbougerra N, Hornedo-Ortega R, Garcia F, et al (2021) Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents: A review. *Trends in Food Science & Technology* 112:362–381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.060>
11. Wibowo A, Ahmat N, Hamzah AS, et al (2011) Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. *Fitoterapia* 82:676–681. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.02.006>
12. Liu S, Li Y, Yi F, et al (2020) Resveratrol oligomers from *Paeonia suffruticosa* protect mice against cognitive dysfunction by regulating cholinergic, antioxidant and anti-inflammatory pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 260:. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112983>
13. Amin HIM, Hussain FHS, Najmaldin SK, et al (2021) Phytochemistry and Biological Activities of Iris Species Growing in Iraqi Kurdistan and Phenolic Constituents of the Traditional Plant *Iris postii*. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26:. <https://doi.org/10.3390/molecules26020264>
14. Azmin NFN, Ahmat N, Syah YM, et al (2014) A new stilbenoid compound from the lianas of *Gnetum microcarpum*. *Natural Product Communications* 9:1743–1744. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400901221>
15. Li XM, Lin M, Wang YH, Liu X (2004) Four new stilbenoids from the lianas of *Gnetum montanum* f. *megalocarpum*. *Planta Medica* 70:160–165. <https://doi.org/10.1055/s-2004-815494>
16. Iliya I, Ali Z, Tanaka T, et al (2002) Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (Gnetaceae). *Phytochemistry* 61:959–961. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00289-3)
17. Tanaka T, Ito T, Iinuma M, et al (2000) Stilbene oligomers in roots of *Sophora davidii*. *Phytochemistry* 53:1009–1014. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00016-9)
18. Kurihara H, Kawabata J, Ichikawa S, Mizutani J (1990) (–)- $\epsilon$ -Viniferin and related oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb. (Cyperaceae). *Agricultural and Biological Chemistry* 54:1097–1099. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870044>
19. Suzuki K, Shimizu T, Kawabata J, Mizutani J (1987) New 3,5,4'-Trihydroxystilbene (Resveratrol) Oligomers from *Carex fedia* Nees var. *miyabei* (Franchet) T. Koyama (Cyperaceae). *Agricultural and Biological Chemistry* 51:1003–1008. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.1003>
20. Lambert C, Lemaire J, Auger H, et al (2019) Optimize, modulate, and scale-up resveratrol and resveratrol dimers bioproduction in *Vitis labrusca* L. Cell suspension from flasks to 20 l bioreactor. *Plants* 8:. <https://doi.org/10.3390/plants8120567>
21. Biais B, Krisa S, Cluzet S, et al (2017) Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4952–4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
22. Gabaston J, Cantos-Villar E, Biais B, et al (2017) Stilbenes from *Vitis vinifera* L. Waste: A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:2711–2718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00241>
23. el Khawand T, Courtois A, Valls J, et al (2018) A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews* 17:1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>

24. Guerrero RF, Valls-Fonayet J, Richard T, Cantos-Villar E (2020) A rapid quantification of stilbene content in wine by ultra-high pressure liquid chromatography – Mass spectrometry. *Food Control* 108:. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106821>
25. Kim J, Min JS, Kim D, et al (2017) A simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for trans- $\epsilon$ -viniferin quantification in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 134:116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.044>
26. Courtois A, Atgié C, Marchal A, et al (2018) Tissue distribution and metabolism of trans- $\epsilon$ -viniferin after intraperitoneal injection in rat. *Nutrients* 10:1–11. <https://doi.org/10.3390/nu10111660>
27. Medrano-Padial C, Puerto M, Prieto AI, et al (2021) In Vivo Genotoxicity Evaluation of a Stilbene Extract Prior to Its Use as a Natural Additive: A Combination of the Micronucleus Test and the Comet Assay. *Foods* 10:439. <https://doi.org/10.3390/foods10020439>
28. Caillaud M, Guillard J, Richard D, et al (2019) Trans  $\epsilon$  viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic Alzheimer model. *PLoS ONE* 14:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212663>
29. Liu Q, Liao X, Xu J, et al (2014) Development and validation of a sensitive and selective LC-MS/MS method for the determination of trans  $\delta$ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer, in rat plasma and its application to pharmacokinetics and bioavailability studies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 958:124–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.026>
30. Mao P, Lei Y, Zhang T, et al (2016) Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism and excretion of  $\delta$ -viniferin in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 6:243–252. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.03.008>
31. Willenberg I, Michael M, Wonik J, et al (2015) Investigation of the absorption of resveratrol oligomers in the Caco-2 cellular model of intestinal absorption. *Food Chemistry* 167:245–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.103>
32. Calvo-Castro LA, Schiborr C, David F, et al (2018) The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Molecular Nutrition and Food Research* 62:. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701057>
33. Willenberg I, Brauer W, Empl MT, Schebb NH (2012) Development of a rapid LC-UV method for the investigation of chemical and metabolic stability of resveratrol oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:7844–7850. <https://doi.org/10.1021/jf302136t>
34. Courtois A, Jourdes M, Dupin A, et al (2017) In vitro glucuronidation and sulfation of  $\epsilon$ -viniferin, a resveratrol dimer, in humans and rats. *Molecules* 22:. <https://doi.org/10.3390/molecules22050733>
35. Kong Q, Ren X, Hu R, et al (2016) Isolation and purification of two antioxidant isomers of resveratrol dimer from the wine grape by counter-current chromatography. *Journal of Separation Science* 39:2374–2379. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600004>
36. Nopo-Olazabal C, Hubstenberger J, Nopo-Olazabal L, Medina-Bolivar F (2013) Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry. J Agric Food Chem*, pp 11744–11758

37. Privat C, Telo JP, Bernardes-Genisson V, et al (2002) Antioxidant properties of trans- $\epsilon$ -Viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1213–1217. <https://doi.org/10.1021/jf010676t>
38. Sáez V, Pastene E, Vergara C, et al (2018) Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry* 265:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.050>
39. Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, et al (2002) Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated from Seeds of Paeoni. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66:1990–1993. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1990>
40. Yin X, Yu J, Kong Q, Ren X (2017) Mechanism of isomers and analogues of resveratrol dimers selectively quenching singlet oxygen by UHPLC-ESI-MS2. *Food Chemistry* 237:1101–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.021>
41. Kamarozaman AS, Latip J, Syah YM, et al (2013) Oligostilbenoids from *Vatica pauciflora* and the oxidative effect on cancer cells. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing
42. Tarhan S, Özdemir F, İncesu Z, Demirkan ES (2016) Direct and protective effects of single or combined addition of vincristine and  $\epsilon$ -viniferin on human HepG2 cellular oxidative stress markers in vitro. *Cytotechnology* 68:1081–1094. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9863-z>
43. Xueyan R, Jia Y, Xuefeng Y, et al (2018) Isolation and purification of five phenolic compounds from the Xinjiang wine grape (*Vitis Vinifera*) and determination of their antioxidant mechanism at cellular level. *European Food Research and Technology* 244:1569–1579. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3070-z>
44. Medrano-Padial C, Puerto M, Richard T, et al (2021) Protection and reversion role of a pure stilbene extract from grapevine shoot and its major compounds against an induced oxidative stress. *Journal of Functional Foods* 79:. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104393>
45. Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, et al (2002) Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated from Seeds of Paeoni. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66:1990–1993. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1990>
46. Kong Q, Ren X, Hu R, et al (2016) Isolation and purification of two antioxidant isomers of resveratrol dimer from the wine grape by counter-current chromatography. *Journal of Separation Science* 39:2374–2379. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600004>
47. Biais B, Krisa S, Cluzet S, et al (2017) Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4952–4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
48. Medrano-Padial C, Puerto M, Richard T, et al (2021) Protection and reversion role of a pure stilbene extract from grapevine shoot and its major compounds against an induced oxidative stress. *Journal of Functional Foods* 79:. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104393>
49. Chen L, Deng H, Cui H, et al (2018) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9:7204–7218
50. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15:252–259

51. Willenberg I, Meschede AK, Gueller F, et al (2015) Food polyphenols fail to cause a biologically relevant reduction of COX-2 activity. *PLoS ONE* 10:e0139147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139147>
52. Ha DT, Long PT, Hien TT, et al (2018) Anti-inflammatory effect of oligostilbenoids from *Vitis heyneana* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via suppressing the NF-KB activation. *Chemistry Central Journal* 12:. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0386-5>
53. Wang KT, Chen LG, Tseng SH, et al (2011) Anti-inflammatory effects of resveratrol and oligostilbenes from *vitis thunbergii* var. *taiwaniana* against lipopolysaccharide-induced arthritis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:3649–3656. <https://doi.org/10.1021/jf104718g>
54. Ha DT, Long PT, Hien TT, et al (2018) Anti-inflammatory effect of oligostilbenoids from *Vitis heyneana* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via suppressing the NF-KB activation. *Chemistry Central Journal* 12:. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0386-5>
55. Nassra M, Krisa S, Papastamoulis Y, et al (2013) Inhibitory activity of plant stilbenoids against nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Planta Medica* 79:966–970. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328651>
56. Kurundkar D, Kurundkar AR, Bone NB, et al (2019) SIRT3 diminishes inflammation and mitigates endotoxin-induced acute lung injury. *JCI Insight* 4:. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120722>
57. Zhang H, Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 8:33–42
58. Hussain T, Tan B, Yin Y, et al (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016
59. Zhang Y, Jayaprakasam B, Seeram NP, et al (2004) Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:228–233. <https://doi.org/10.1021/jf034616u>
60. Huang CC, Tung YT, Cheng KC, Wu JH (2011) Phytocompounds from *Vitis kelungensis* stem prevent carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chemistry* 125:726–731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.085>
61. Gewaltig MT, Kojda G (2002) Vasoprotection by nitric oxide: Mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular Research* 55:250–260
62. Watson T, Goon PKY, Lip GYH (2008) Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxidants and Redox Signaling* 10:1079–1088
63. Mi YY, Oh KS, Jung WL, et al (2007) Vasorelaxant effect of stilbenes from rhizome extract of rhubarb (*Rheum undulatum*) on the contractility of rat aorta. *Phytotherapy Research* 21:186–189. <https://doi.org/10.1002/ptr.2042>
64. Zghonda N, Yoshida S, Araki M, et al (2011) Greater effectiveness of  $\epsilon$ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75:1259–1267. <https://doi.org/10.1271/bbb.110022>
65. Arraki K, Totoson P, Decendit A, et al (2017) Cyperaceae Species Are Potential Sources of Natural Mammalian Arginase Inhibitors with Positive Effects on Vascular Function. *Journal of Natural Products* 80:2432–2438. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00197>



66. Wu CW, Nakamoto Y, Hisatome T, et al (2020) Resveratrol and its dimers  $\epsilon$ -viniferin and  $\delta$ -viniferin in red wine protect vascular endothelial cells by a similar mechanism with different potency and efficacy. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 36:535–542. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12199>
67. Fernandez-Cruz E, Cerezo AB, Cantos-Villar E, et al (2019) Inhibition of VEGFR-2 Phosphorylation and Effects on Downstream Signaling Pathways in Cultivated Human Endothelial Cells by Stilbenes from *Vitis* Spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67:3909–3918. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00282>
68. Su PS, Doerksen RJ, Chen SH, et al (2015) Screening and profiling stilbene-type natural products with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* (Planch.) Rehder. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 108:70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.053>
69. Zghonda N, Yoshida S, Araki M, et al (2011) Greater effectiveness of  $\epsilon$ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75:1259–1267. <https://doi.org/10.1271/bbb.110022>
70. Zghonda N, Yoshida S, Ezaki S, et al (2012)  $\epsilon$ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76:954–960. <https://doi.org/10.1271/bbb.110975>
71. Eseberri I, Lasa A, Churruga I, Portillo MP (2013) Resveratrol metabolites modify adipokine expression and secretion in 3T3-L1 pre-adipocytes and mature adipocytes. *PLoS one* 8:e63918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063918>
72. Ohara K, Kusano K, Kitao S, et al (2015)  $\epsilon$ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468:877–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.047>
73. Lu YL, Lin SY, Fang SU, et al (2017) Hot-water extracts from roots of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* and identified  $\sigma$ -viniferin improve obesity in high-fat diet-induced mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:2521–2529. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00327>
74. Hung MW, Wu CW, Kokubu D, et al (2019)  $\epsilon$ -viniferin is more effective than resveratrol in promoting favorable adipocyte differentiation with enhanced adiponectin expression and decreased lipid accumulation. *Food Science and Technology Research* 25:817–826. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.817>
75. Oshima Y, Namao K, Kamijou A, et al (1995) Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). *Experientia* 51:63–66. <https://doi.org/10.1007/BF01964921>
76. Ngoc TM, Minh PTH, Hung TM, et al (2008) Lipoxygenase inhibitory constituents from rhubarb. *Archives of Pharmacal Research* 31:598–605. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1199-0>
77. Koo M, Kim SH, Lee N, et al (2008) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitory effect of *Vitis vinifera*. *Fitoterapia* 79:204–206. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.005>
78. Guschlbauer M, Klinger S, Burmester M, et al (2013) Trans-Resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin decrease glucose absorption in porcine jejunum and ileum in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 165:313–318. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.040>

79. Ohara K, Kusano K, Kitao S, et al (2015)  $\epsilon$ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468:877–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.047>
80. Karaki SI, Ishikawa J, Tomizawa Y, Kuwahara A (2016) Effects of  $\epsilon$ -viniferin, a dehydrodimer of resveratrol, on transepithelial active ion transport and ion permeability in the rat small and large intestinal mucosa. *Physiological Reports* 4:1–17. <https://doi.org/10.14814/phy2.12790>
81. Sasikumar P, Lekshmy K, Sini S, et al (2019) Isolation and characterization of resveratrol oligomers from the stem bark of *Hopea ponga* (Dennst.) Mabb. And their antidiabetic effect by modulation of digestive enzymes, protein glycation and glucose uptake in L6 myocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 236:196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.046>
82. Mattio LM, Marengo M, Parravicini C, et al (2019) Inhibition of Pancreatic  $\alpha$ -amylase by Resveratrol Derivatives: Biological activity and molecular modelling evidence for cooperativity between viniferin enantiomers. *Molecules* 24:. <https://doi.org/10.3390/molecules24183225>
83. Liu R, Zhang Y, Yao X, et al (2020)  $\epsilon$ -Viniferin, a promising natural oligostilbene, ameliorates hyperglycemia and hyperlipidemia by activating AMPK: In vivo. *Food and Function* 11:10084–10093. <https://doi.org/10.1039/d0fo01932a>
84. Lu YL, Lin SY, Fang SU, et al (2017) Hot-water extracts from roots of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* and identified  $\sigma$ -viniferin improve obesity in high-fat diet-induced mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:2521–2529. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00327>
85. Sharma A, Boise LH, Shanmugam M (2019) Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers* 11
86. Billard C, Izard JC, Roman V, et al (2002) Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin and vine-shots derived polyphenols (Vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia and Lymphoma* 43:1991–2002. <https://doi.org/10.1080/1042819021000015952>
87. Barjot C, Tournaire M, Castagnino C, et al (2007) Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sciences* 81:1565–1574. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.047>
88. Nivelle L, Aires V, Rioult D, et al (2018) Molecular analysis of differential antiproliferative activity of resveratrol, epsilon viniferin and labruscol on melanoma cells and normal dermal cells. *Food and Chemical Toxicology* 116:323–334. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.043>
89. Özdemir F, Akalin G, Şen M, et al (2014) Towards novel anti-tumor strategies for hepatic cancer:  $\epsilon$ -viniferin in combination with vincristine displays pharmacodynamic synergy at lower doses in HepG2 cells. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 18:324–334. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0045>
90. Özdemir F, İncesu Z, Şena M, et al (2016) Implications of enhanced effectiveness of vincristine sulfate/ $\epsilon$ -viniferin combination compared to vincristine sulfate only on HepG2 cells. *Dicle Tıp Dergisi* 43:534–541
91. Özdemir F, Apaydın E, Önder Nİ, et al (2018) Apoptotic effects of  $\epsilon$ -viniferin in combination with cis-platin in C6 cells. *Cytotechnology* 70:1061–1073. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0197-5>

92. Ito T, Akao Y, Yi H, et al (2003) Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. *Carcinogenesis* 24:1489–1497. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg105>
93. Muhtadi, Hakim EH, Juliawaty LD, et al (2006) Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia* 77:550–555. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.004>
94. Nazri NAAM, Ahmat N, Abdullah M, et al (2012) Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of resveratrol oligomers of *shorea macroptera* dyer. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 6:431–436
95. Wibowo A, Ahmat N, Hamzah AS, et al (2014) Identification and biological activity of secondary metabolites from *Dryobalanops beccarii*. *Phytochemistry Letters* 9:117–122. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.05.001>
96. Colin D, Lancon A, Delmas D, et al (2008) Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. *Biochimie* 90:1674–1684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.006>
97. Aja I, Begoña Ruiz-Larrea M, Courtois A, et al (2020) Screening of natural stilbene oligomers from *vitis vinifera* for anticancer activity on human hepatocellular carcinoma cells. *Antioxidants* 9:. <https://doi.org/10.3390/antiox9060469>
98. Jeong HY, Kim JY, Lee HK, et al (2010) Leaf and stem of *Vitis amurensis* and its active components protect against amyloid  $\beta$  protein (25-35)-induced neurotoxicity. *Archives of Pharmacal Research* 33:1655–1664. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1015-6>
99. Kim JY, Jeong HY, Lee HK, et al (2012) Neuroprotection of the leaf and stem of *Vitis amurensis* and their active compounds against ischemic brain damage in rats and excitotoxicity in cultured neurons. *Phytomedicine* 19:150–159. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.015>
100. Fu J, Jin J, Cichewicz RH, et al (2012) Trans-(-)- $\epsilon$ -viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated Protein Kinase (AMPK), and protects cells in models of huntington disease. *Journal of Biological Chemistry* 287:24460–24472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382226>
101. Zhang S, Ma Y, Feng J (2020) Neuroprotective mechanisms of  $\epsilon$ -viniferin in a rotenone-induced cell model of Parkinson's disease: Significance of SIRT3-mediated FOXO3 deacetylation. *Neural Regeneration Research* 15:2143–2153. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.282264>
102. Naia L, Carmo C, Campesan S, et al (2021) Mitochondrial SIRT3 confers neuroprotection in Huntington's disease by regulation of oxidative challenges and mitochondrial dynamics. *Free Radical Biology and Medicine* 163:163–179. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.031>
103. Rivière C, Richard T, Quentin L, et al (2007) Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15:1160–1167. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.069>
104. Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin PY, et al (2010) New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 20:3441–3443. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.074>
105. Zga N, Papastamoulis Y, Toribio A, et al (2009) Preparative purification of anti-amyloidogenic stilbenoids from *Vitis vinifera* (Chardonnay) stems by centrifugal partition chromatography. *Journal*

of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 877:1000–1004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.026>

106. Vion E, Page G, Bourdeaud E, et al (2018) Trans  $\epsilon$ -viniferin is an amyloid- $\beta$  disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 88:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.12.003>
107. Seino S, Kimoto T, Yoshida H, et al (2018) Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid- $\beta$  1–42 (A $\beta$ 42) production and ameliorates A $\beta$ 42-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomedical Research (Japan)* 39:105–115. <https://doi.org/10.2220/biomedres.39.105>
108. Sergi D, Alex G, Beaulieu J, et al (2021)  $\epsilon$ -Viniferin in a Neuron – Glia Co-Culture Cellular Model of Parkinson's Disease
109. Yim NH, Ha DT, Trung TN, et al (2010) The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 20:1165–1168. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.020>
110. Basri DF, Luoi CK, Azmi AM, Latip J (2012) Evaluation of the combined effects of stilbenoid from *Shorea gibbosa* and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pharmaceuticals* 5:1032–1043. <https://doi.org/10.3390/ph5091032>
111. Sahidin I, Wahyuni W, Malaka MH, Imran I (2017) Antibacterial and cytotoxic potencies of stilbene oligomers from stem barks of baoti (*Dryobalanops lanceolata*) growing in Kendari, Indonesia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10:139–143. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18664>
112. Lee JH, Kim YG, Ryu SY, et al (2014) Resveratrol oligomers inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 77:168–172. <https://doi.org/10.1021/np400756g>
113. Cho HS, Lee JH, Ryu SY, et al (2013) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm formation by plant metabolite  $\epsilon$ -viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:7120–7126. <https://doi.org/10.1021/jf4009313>
114. Medrano-Padial C, Prieto AI, Puerto M, Pichardo S (2021) Toxicological Evaluation of Piceatannol, Pterostilbene, and  $\epsilon$ -Viniferin for Their Potential Use in the Food Industry: A Review. *Foods* 10:592. <https://doi.org/10.3390/foods10030592>
115. Turck D, Bresson JL, Burlingame B, et al (2016) Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 14:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4594>

## 2. La stéatose hépatique non-alcoolique

### 2.1 Présentation générale des NAFLD

Les stéatoses hépatiques représentent un large spectre de différentes pathologies du foie. Par définition, la stéatose hépatique est l'accumulation anormale de lipides (supérieur à 5% de sa masse totale). La forme la moins grave des NAFLD est la stéatose hépatique dite pure, c'est-à-dire qu'elle ne provoque pas d'inflammation. Dans ce cas-là, il n'y a pas de symptômes, si ce n'est de l'inconfort au niveau de l'abdomen et une fatigue générale. Lorsque le foie subit une inflammation, notamment liée aux macrophages du foie, ou cellules de Kupffer, la NAFLD devient alors une stéatohépatite (*non-alcoholic steato hepatitis*, NASH), alors à l'origine de pathologies plus graves, comme les fibroses, les cirrhoses ou les cancers du foies (carcinome hépatocellulaire) [153,154].

La prévalence des stéatoses hépatiques est difficile à déterminer en raison des différentes méthodes de diagnostic, les plus utilisées étant les échographies et le dosage plasmatique des transaminases. La proportion de patients atteints est estimée à 30 % dans la population américaine (devenant la deuxième cause de transplantation hépatique de ce pays), et varie de 20 à 30% en Europe [155], la moyenne étant estimée à 24%. Dans une méta-analyse regroupant plusieurs dizaines d'études et impliquant plus de 8 millions de patients, Younossi *et al.* (2016), ont indiqué l'existence d'une prévalence plus importante chez les sujets atteints d'obésité, d'hypertension, d'hyperlipidémie, de diabète de type II et du syndrome métabolique [156]. La pandémie d'obésité actuelle tend à augmenter dans les prochaines années le nombre de patients atteints de stéatoses hépatiques.

L'accumulation de TG dans le foie est un phénomène faisant intervenir plusieurs processus : l'absorption des acides gras par les hépatocytes, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la lipogénèse *de novo*, l'assemblage des TG et leur sécrétion dans le sang, dont les principaux mécanismes sont schématisés en figure 16. Un déséquilibre de la balance entre ces phénomènes d'acquisition ou d'élimination des acides gras entraînera une accumulation anormale de TG et le développement d'une stéatose.

### 2.2 Mécanismes impliqués dans les NAFLD

Environ 60% des acides gras libres circulant dans le sang qui vont rejoindre le foie sont issus de la lipolyse des tissus adipeux blancs. Ces tissus adipeux sont constitués entre autres d'adipocytes matures. Ces cellules stockent les lipides sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques. En condition de jeun et sous l'action de l'épinéphrine notamment, les cellules vont libérer les TG sous forme d'acide gras libre et de glycérol, faisant intervenir les enzymes *adipose tissue triglyceride lipase* (ATGL), l'enzyme *hormone sensitive lipase* (HSL), après sa phosphorylation par une protéine kinase et la *monoglyceride lipase* (MGL). Les acides gras (hydrophobes) libres vont alors se lier à l'albumine pour circuler dans le sang et rejoindront alors le foie où ils seront absorbés.

### 2.2.1 Absorption des acides gras

Plusieurs transporteurs membranaires permettent l'internalisation des acides gras libres : les *fatty acid transporter protein* (FATP), les cavéolines, les *fatty acid translocase* (FAT) et les *cluster differentiation 36* (CD36). Les FATP et les CD36 sont des protéines surexprimées chez les sujets obèses et régulées par le *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), qui facilitent la diffusion des acides gras à longue chaîne. Une augmentation de l'acide ribonucléique messager (ARNm) et des protéines CD36 a d'ailleurs été mise en évidence sur un modèle de souris obèses [157]. Concernant les FATP, les isoformes 1 et 5 sont les isoformes majoritairement exprimées dans les hépatocytes.

Une fois à l'intérieur des cellules, dans le milieu cytoplasmique, les acides gras hydrophobes vont se lier aux protéines cytosoliques de liaisons aux lipides (FABP) dont les isoformes 1 et 5 sont les plus exprimées dans le foie. Les FABP vont alors permettre d'apporter les acides gras nécessaires à la  $\beta$ -oxydation qui a lieu dans la membrane interne des mitochondries.

### 2.2.2 La $\beta$ -oxydation mitochondriale

La  $\beta$ -oxydation a pour but de réduire les acides gras en acétyl-CoA en raccourcissant les chaînes notamment, pour pouvoir produire de l'énergie. C'est donc une réaction de dégradation. La première étape pour les acides gras est de rejoindre l'intérieur de la mitochondrie depuis le cytoplasme (Figure 15). Ils vont dans un premier temps être transformés sous l'action de l'acyl-CoA synthase en acyl-CoA. Cette réaction est appelée réaction d'activation, car la co-enzyme permet de mieux solubiliser les longues chaînes carbonées et leur donner une certaine réactivité. Le groupement acyl va alors s'attacher à la carnitine, sous l'action de l'enzyme transmembranaire CPT1a (pour *carnitine palmitoyl transferase 1a*). L'acyl-carnitine va alors pouvoir traverser la membrane externe de la mitochondrie et rejoindre la membrane interne, transporté par une translocase. A ce niveau, le groupement acyl est restitué à une co-enzyme A, catalysé par CPT2.

Une fois dans la matrice interne de la mitochondrie, l'acyl-CoA subit la  $\beta$ -oxydation qui est constituée de 4 étapes consécutives :

- une déshydrogénation, catalysée par l'acyl-CoA déshydrogénase, donnera un déhydro-acyl-CoA, cette réaction implique une réduction de la flavine adénine dinucléotide (FAD) en FADH<sub>2</sub> ;
- une hydratation de la double liaison C2-C3 donnera un  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA ;
- une déshydrogénation, cette réaction entraîne également la production d'équivalent réducteur en produisant la nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH, H<sup>+</sup>) depuis le NAD<sup>+</sup> ;
- une rupture de la liaison  $\alpha$ - $\beta$  qui libère de l'acétyl-CoA, et un acyl-CoA avec (n-2) carbones.

L'acyl-CoA, désormais plus court de deux carbones, servira de substrat pour subir une nouvelle fois une  $\beta$ -oxydation. Un cycle des 4 réactions de la  $\beta$ -oxydation entraîne par conséquent la production d'un acétyl-CoA, d'un NADH, H<sup>+</sup>, et d'un FADH<sub>2</sub>. L'acétyl-CoA, lui, pourra être utilisé par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. De ce fait, un dysfonctionnement au niveau de l'apport des acides gras et leurs transformations

dans la mitochondrie ou de l'oxydation de ces acides gras entrainera une accumulation des TG dans les cellules hépatocytaires, à l'origine du développement des stéatoses. A l'opposé de la  $\beta$ -oxydation, la lipogenèse *de novo* a pour but de produire des acides gras à partir d'acétyl CoA. Ces acides gras seront utilisés avec le glycérol pour la synthèse des TG.

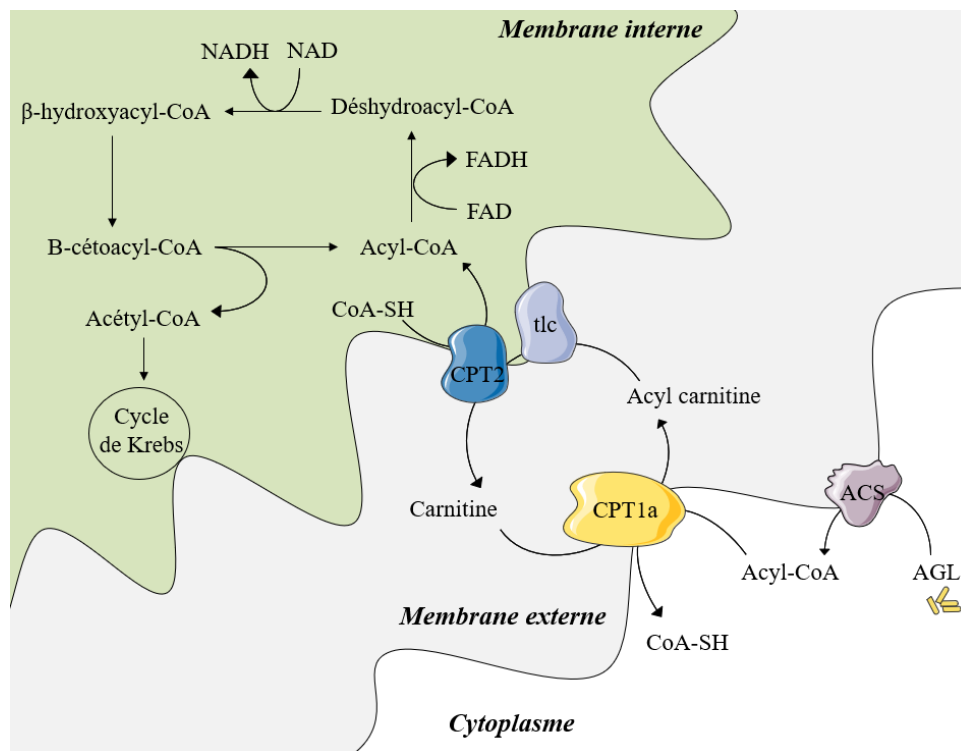


Figure 15. Mécanismes principaux de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale

### 2.2.3 Lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* est la formation d'acides gras depuis le glucose issu de l'alimentation. Ce glucose est transformé en pyruvate qui est alors utilisé par le cycle de Krebs, dans la mitochondrie, pour produire du citrate. Le citrate va alors se transformer en acétyl-CoA sous l'action de la citrate lyase dans le cytoplasme.

L'acétyl-CoA cytoplasmique va être carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour donner du malonyl-CoA, transformé ensuite en palmitate sous l'action de la *fatty acid synthase* (FAS). Les acides gras ainsi formés vont ensuite subir des désaturations, élongation et/ou estérification, puis vont s'assembler en diacylglycérols (DG) puis TG sous l'action de l'enzyme *diacylglycérol O-acyltransférase* (DAGT). La lipogenèse *de novo* est régulée par deux facteurs de transcription clé : le *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c), activé par l'insuline, et le *carbohydrate regulatory element-binding protein* (ChREBP) activé par les carbohydrates [158]. Les TG formés vont être stockés dans la cellule (dans des gouttelettes lipidiques) ou exportés en dehors de la cellule par sécrétion, sous forme de VLDL (*very light density lipoproteins*) afin d'être éliminés ou distribués. Une hyperactivité de la lipogenèse entrainera par conséquent une surproduction de TG et le développement d'une hypertriglycémie et d'une stéatose [159].

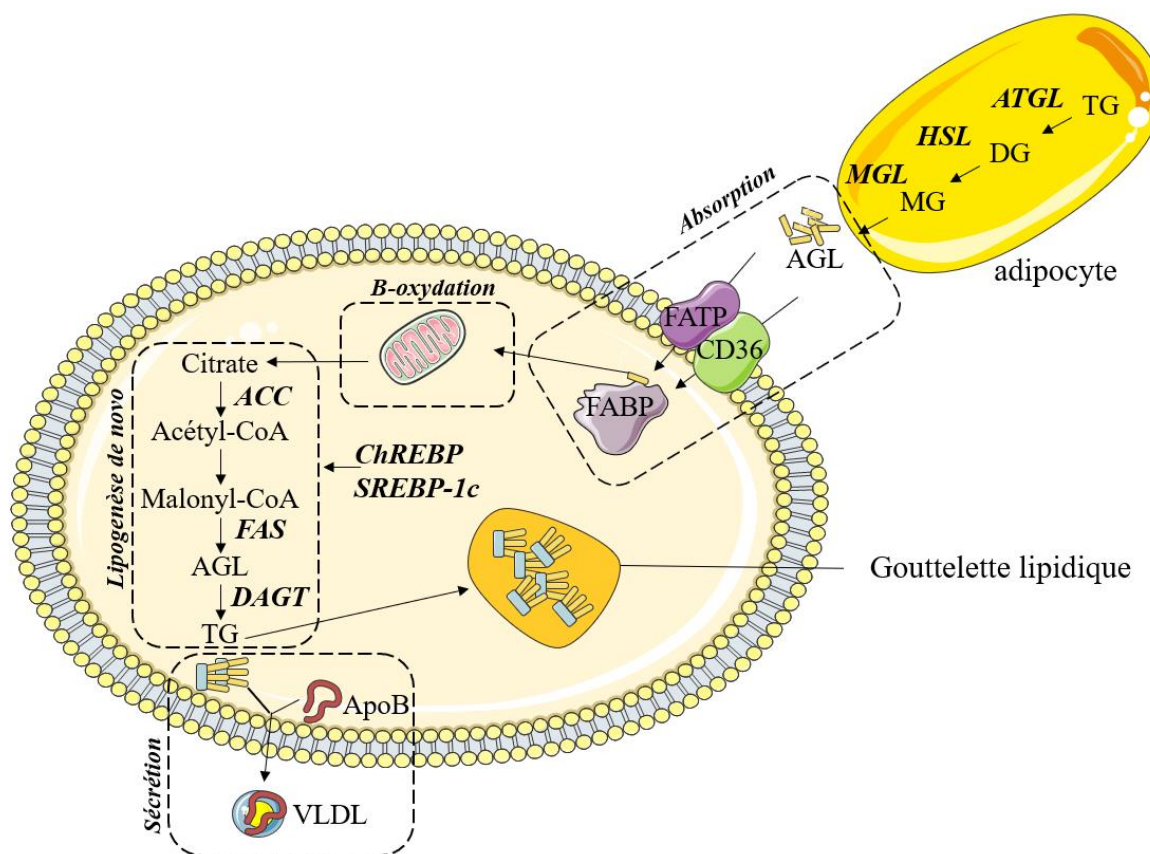


Figure 16. Principaux mécanismes impliqués dans l'accumulation des triglycérides dans les cellules du foie. L'accumulation de triglycéride est régie par quatre processus ; l'absorption des acides gras libres, leur  $\beta$ -oxydation, la lipogénèse *de novo* et la sécrétion des triglycérides.

#### 2.2.4 La sécrétion des triglycérides

Les TG vont s'associer avec un cholestérol ester et une apolipoprotéine B 100 (apoB100). Cette protéine produite par le foie, va subir une translocation dans le réticulum endoplasmique, avant d'avoir une maturation dans l'appareil de Golgi et d'être externalisée par exocytose. L'assemblage TG et cholestérol (formant alors le corps lipidique) avec apoB100 et des phospholipides hydrophiles va former des VLDL, qui vont alors permettre la circulation des TG dans le sang.

Ces 4 mécanismes sont responsables de la balance absorption/élimination de TG par le foie. Un déséquilibre de cette balance va donc provoquer le développement de stéatose hépatique. Ce stade relativement bénin de la maladie peut malheureusement évoluer vers des formes plus graves, comme la NASH [153], puis la cirrhose et le cancer du foie [160]. En effet, une surexposition du foie aux acides gras, venus de l'alimentation ou de la lipolyse adipocytaire, va entraîner une hyperactivité de la  $\beta$ -oxydation. Cette  $\beta$ -oxydation, qui a lieu dans la mitochondrie, va alimenter d'une part le cycle de Krebs avec l'acétyl-CoA et d'autre part, la production d'électrons à haut potentiel (NADH et FADH<sub>2</sub>) va alimenter la chaîne respiratoire située dans la membrane interne de la mitochondrie. Par ailleurs, cette alimentation entraîne une fuite d'électron dans la chaîne respiratoire, entraînant, à terme, un stress oxydatif, normalement contrôlé par des protéines telle que *uncoupling protein 2* (UCP2) dans l'espace



mitochondrial [161]. Ce stress oxydatif va provoquer l'activation des cellules immunitaires du foie et donc l'inflammation. C'est cette inflammation, qui est à l'origine des complications des stéatoses hépatiques dites pures [160]. L'inflammation et le stress oxydant sont donc deux mécanismes étroitement liés au développement des stéatoses hépatiques, et sont également eux-mêmes liés à l'obésité et la résistance à l'insuline. Ces associations de dysfonctionnement forment ce que l'on appelle le syndrome métabolique.

### 2.3 Intérêt des stilbènes

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été menées dans le but de déterminer l'impact des stilbènes sur le développement des NAFLD.

De nombreuses études ont montré que le resvératrol présente des activités anti-stéatosiques intéressantes [162]. Il a en effet été testé sur la lignée cellulaire hépatique HepG2. Cette lignée cellulaire d'hépatocytes peut mimer la stéatose hépatique en accumulant des triglycérides après exposition à des acides gras, comme le palmitate. Dans ces conditions modèles, le resvératrol a montré une diminution de l'accumulation des TG. De plus, il a été montré que l'exposition de ces cellules au resvératrol entraînait une diminution de l'activité de ACC (notamment par l'augmentation de sa phosphorylation), FAS et une diminution des ARN messagers de SREBP1c et FAS. Ces études mécanistiques suggèrent que le resvératrol aurait un rôle protecteur dans le développement de la stéatose hépatique, et notamment en agissant sur la lipogenèse *de novo* [163–165]. *In vivo*, le resvératrol a été testé sur ses capacités à limiter le développement de la stéatose hépatique induite par une alimentation riche en graisse et en sucre. D'après les études, le resvératrol diminuerait la taille et le nombre des gouttelettes lipidiques présentes dans le foie et induite par le régime hypercalorique, diminuerait la masse du foie et l'accumulation de TG. Les mécanismes d'actions ont également été mis en évidence dans plusieurs études. Il semblerait que le resvératrol augmente le nombre de mitochondries dans les cellules du foie, diminue le stress oxydatif, et augmente l'expression de gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation [166]. Là encore, l'implication du resvératrol dans la voie de la lipogenèse *de novo* a été mis en évidence [163,167–169].

D'autres monomères du resvératrol ont également été étudiés sur leur capacité à réduire l'accumulation de lipides dans les cellules du foie. Dans une étude sur souris nourries avec un régime hypercalorique, il a été montré que l'apport par l'alimentation de 0,25% et 0,5% d'oxyresvératrol durant 8 semaines entraînait une diminution de la stéatose hépatique. Dans cette étude, les auteurs ont également montré une diminution de l'expression SREBP, FAS et CEBP $\alpha$ , et une augmentation de l'activation de l'adénosine monophosphate protéine kinase (AMPK) [170]. Plus tard, une seconde étude a confirmé les propriétés de diminution des TG de ce composé, et notamment son action sur la lipogenèse *de novo* [171]. Sur la lignée cellulaire HepG2 [172], le picéatannol a montré des propriétés de diminution de TG en diminuant la lipogenèse *de novo* (diminution des ARNm de SREBP1 et ACC), en diminuant le transport des acides gras (diminution de l'ARNm de CD36) et en favorisant la  $\beta$ -oxydation (augmentation des ARNm de PPAR $\alpha$  et CPT1a [172]). Sur une autre lignée cellulaire, les AML-12, le ptérostilbène a montré des propriétés de diminution des TG en diminuant l'expression de la

protéine FAS, et en augmentant celle de CTP1a [173]. *In vivo*, il a été montré que ce monomère agissait aussi bien sur la lipogenèse *de novo* que sur l'assemblage et la sécrétion de TG, la  $\beta$ -oxydation, le stress oxydant et l'inflammation liés au développement de la stéatose [174–176].

En prenant en considération le métabolisme des stilbènes et plus précisément la présence de métabolites sulfo-conjugués et glucurono-conjugués dans l'organisme ainsi que les activités *in vivo* des stilbènes, de récents travaux se sont intéressés aux activités anti-stéatosiques de ces métabolites [167,177,178]. En effet, il est intéressant de déterminer si les métabolites, les formes natives, ou les deux, sont à l'origine des activités biologiques *in vivo*.

Récemment, une équipe a étudié les propriétés *in vitro* des métabolites de stilbènes sur hépatocytes. A 1  $\mu$ M, les métabolites glucuronidés et sulfatés du ptérostilbène montrent une diminution de l'accumulation des TG sur la lignée cellulaire hépatocytaire AML-12 après induction de l'accumulation de TG par le palmitate. Après analyse par Western Blot (WB) de l'expression de protéine d'intérêt, il s'est avéré que les métabolites diminuaient l'activité protéique de FAS, et de CTP1a de manière significative, contribuant ainsi à l'activité de diminution des TG du ptérostilbène observé *in vivo* dans d'autres études [173]. Les métabolites du resvératrol ont également été étudiés sur ce modèle cellulaire [179]. Les deux isomères glucuronidés du resvératrol, le resvératrol3-O-sulfate ainsi que le dihydroresvératrol ont montré un effet positif et significatif sur la diminution de l'accumulation de TG, notamment en diminuant l'activité des protéines FAS, CTP1a et FATP2 [179].

Les monomères du stilbènes ont montré des effets de diminution des TG *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de stéatose hépatiques, après exposition des cellules aux acides gras, ou après un régime hypercalorique chez l'animal. D'après les études mécanistiques, ils auraient notamment des effets sur l'expression des protéines impliquées dans la lipogenèse *de novo* ainsi que dans la  $\beta$ -oxydation. Enfin, leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes démontrées depuis longtemps dans d'autres études viendraient théoriquement compléter leurs propriétés anti-stéatosiques en protégeant l'organisme du développement de la NASH.

A l'heure actuelle et à notre connaissance, aucun dimère pur n'a été testé sur ces modèles de stéatose hépatique. Par ailleurs, comme cela a été expliqué dans le chapitre 2, les stilbènes subissent un fort métabolisme hépatique, notamment une glucuronidation et une sulfatation. Ainsi, bien que le fort métabolisme des stilbènes contribue à la diminution de la biodisponibilité, le métabolisme de ces composés ne serait pas sans intérêt d'un point de vue santé [180].

## Chapitre 4. Encapsulation des stilbènes

Comme nous l'avons vu à la fin du chapitre 1, les stilbènes sont des polyphénols qui peuvent entrer dans la composition de compléments alimentaires. Les stilbènes (ou mélange de stilbènes) pourront être incorporés dans des tablettes ou des capsules. Cependant, leur utilisation peut rencontrer certaines limites. En effet, dans les processus de fabrication et de stockage d'extraits ou de molécules pures, l'exposition à la lumière directe peut engendrer des isomérisations [181,182]. De plus, la faible solubilité en milieu aqueux (0.03 g/L pour le resvératrol) ainsi que les propriétés astringentes rendent difficiles l'incorporation de ces molécules dans les aliments comme les boissons par exemple. D'un point de vue nutritionnel, les environnements physico-chimiques et biologiques des différentes étapes du système digestif contribuent à diminuer la stabilité des molécules par des réactions d'oxydation, d'isomérisation ou encore de métabolisme. Enfin, nous avons vu que les études pharmacocinétiques des stilbènes montrent une très faible biodisponibilité de ces composés.

L'encapsulation des polyphénols fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Selon le moteur de recherches de données bibliographiques PubMed du National Center for Biotechnology Information (NCBI), plus de soixante-dix revues concernent l'encapsulation des polyphénols et le nombre de publications scientifiques contenant « *resveratrol* » et « *encapsulation* » a plus que doublé ces dix dernières années. Ainsi, dans le domaine nutraceutique, l'encapsulation des stilbènes pourrait être un moyen de limiter leur dégradation, mais également d'améliorer leur stabilité dans le tractus gastro-intestinal, leur absorption et par conséquent leur biodisponibilité.

Ce chapitre vise dans un premier temps à fournir un aperçu général des principaux systèmes d'encapsulation existants, avant de résumer les études de l'impact de ces encapsulations sur la stabilité, la biodisponibilité ou encore les activités biologiques des stilbènes. Une attention particulière sera portée à l'encapsulation dans les liposomes multilamellaires de type oignons, qui est la technique utilisée dans le cadre de ces travaux de thèse.

### 1. Différents systèmes d'encapsulation

Il existe de nombreuses méthodes d'encapsulation de composés bioactifs, répertoriées dans plusieurs revues scientifiques. Dans ce paragraphe, différentes techniques d'encapsulation utilisées notamment pour les polyphénols seront brièvement expliquées, alors que la technique des liposomes sera détaillée.

### 1.1 Différentes techniques d'encapsulation

**Les inclusions.** L'inclusion est une technique d'encapsulation moléculaire. Dans ce cas, une molécule dite « hôte » (ou un complexe moléculaire) va piéger le composé d'intérêt par des forces physiques (liaisons hydrogènes, forces de van der Waals). La plus connue et utilisée des molécules permettant l'encapsulation de composés est la cyclodextrine dite « molécule-cage ». Dans le cas du resvératrol, les deux molécules forment un complexe molaire 1:1, et cette association est spontanée [183]. Il existe également l'inclusion dans des levures [184] et dans des protéines telles que la  $\beta$ -lactoglobuline [185] ou le sérum albumine bovin [186].

**Le Freeze-Drying.** Plus connu en français sous le nom de lyophilisation ou dessiccation, c'est une technique très simple et largement utilisée pour l'encapsulation. La co-solubilisation du solvant avec la matrice (comme les maltodextrines par exemple), puis la solubilisation ou la suspension du composé à encapsuler permet, après lyophilisation, la formation d'un complexe molécule/matériau d'encapsulation.

**Le Spray-Drying.** Le séchage par atomisation, ou *spray-drying*, est une autre technique physique d'encapsulation de composés d'intérêts. Ici, le mélange de la matrice (maltodextrine, gommes, *etc*) et du composé à encapsuler est introduit dans un pulvérisateur pour être séché à haute température afin de former des grains de petite taille.

**Les émulsions.** L'émulsion est une technique d'encapsulation couramment utilisée dans les domaines pharmaceutiques et nutraceutiques. Les émulsions peuvent être simples ou doubles, directes ou inverses en fonction du caractère hydrophile ou hydrophobe de la molécule à encapsuler [187]. De façon générale, il s'agit du mélange de deux liquides non miscibles avec ajout potentiel d'un tensioactif. Le mélange de ces deux phases va engendrer la formation de gouttelettes, lipidiques ou aqueuses, de tailles variables (pouvant aller de quelques nanomètres à plusieurs micromètres). L'émulsion la plus basique est l'émulsion simple et directe ; l'ajout d'une phase huileuse dans un milieu aqueux (*Oil-in-water single emulsion*) en présence d'une molécule tensio-active, moyennant un apport d'énergie, va entraîner la formation de gouttes lipidiques, où les têtes polaires des tensio-actifs seront arrangées de telle sorte à être en contact de la phase aqueuse, quand les chaînes hydrocarbonées apolaires seront dirigées à l'intérieur des gouttelettes.

Cette configuration est utilisée pour l'encapsulation de composés hydrophobes qui seront alors piégés dans les chaînes aliphatiques des lipides. A l'opposé, une émulsion inverse est composée de gouttelettes aqueuses dans un milieu huileux (*Water-in-oil single emulsion*), permettant ainsi l'encapsulation de composés hydrophiles. Lorsque les lipides utilisés pour la formation de ces émulsions sont à l'état solide, totalement ou partiellement, on parle alors de nanoparticules lipidiques solides.

Les émulsions doubles peuvent elles aussi être directes ou inverses. Qu'elles soient directes (*Water-in-oil-in-water double emulsion*) ou inverses (*Oil-in-water-in-oil double emulsion*), la nature des phases (aqueuse ou huileuse) peut être différente. L'un des grands avantages des émulsions doubles est la possibilité de co-encapsuler des composés hydrophiles et lipophiles. Ainsi, Aditya *et al.* (2015), ont encapsulé la curcumine et la catéchine, qui sont

respectivement hydrophobe et hydrophile [188]. Plusieurs techniques existent pour produire des émulsions, les plus répandues étant l'homogénéisation et le *solvent removal*.

**Les nanoparticules polymériques.** Très utilisées notamment dans le domaine médical, les nanoparticules polymériques existent sous deux formes. Lorsque la molécule encapsulée est contenue dans la matrice, elle-même formant une sphère inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , on parle de nanosphère. Si la molécule encapsulée est piégée à l'intérieur d'une vésicule sphérique présentant une paroi et un cœur solide ou liquide, on parle de nano-capsule. Le choix du polymère à utiliser pour l'encapsulation de composés dépend de la nature de ce composé mais également de la biocompatibilité du polymère [189]. Souvent fabriqués à partir poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) ou poly-éthylène glycol (PEG), les nanoparticules ont l'avantage d'avoir une efficacité d'encapsulation très importante [190], pouvant varier selon le processus de fabrication [191].

### 1.2 L'encapsulation dans des liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées en général de bicouches phospholipidiques entourant un cœur aqueux (Figure 17). La formation des bicouches phospholipidiques pour la fabrication des liposomes sera expliquée dans la section B.1.

L'un des avantages des liposomes est qu'ils peuvent encapsuler des composés hydrophiles, hydrophobes mais également amphiphiles. En effet, le cœur aqueux permet l'encapsulation de composés hydrophiles, quand l'intérieur des bicouches phospholipidiques, constitué de chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, peut contenir des composés hydrophobes. Les molécules amphiphiles se positionneront alors à l'interface des deux parties.

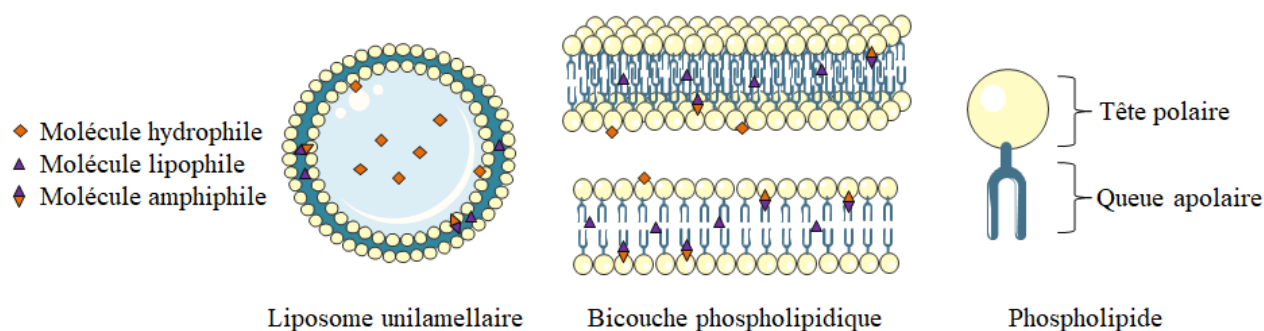


Figure 17. Encapsulation des molécules dans les liposomes. Les molécules hydrophiles vont s'insérer dans le cœur aqueux des liposomes. Les molécules lipophiles vont interagir avec les chaînes aliphatiques des bicouches phospholipidiques. Enfin, les composés amphiphiles pourront s'insérer à l'interface des bicouches phospholipidiques.

### Classification des liposomes

Il existe différentes façons de classer les liposomes : selon leur morphologie, leur composition, leur processus de fabrication ou encore selon leur application. Nous en présenterons ici deux.

### Selon leur application.

En 1998, Gert Storm et Daan J.A. Crommelin ont classé les liposomes en 4 grandes catégories [192] selon leur application :

-les liposomes conventionnels, sont uniquement constitués de phospholipides, neutres ou chargés négativement. Leurs propriétés physico-chimiques varient selon leur charge, leur taille, et la nature des phospholipides utilisés, notamment la longueur des chaînes hydrocarbonées ainsi que leur nombre d'insaturations [193] ;

-les liposomes à longue circulation (*stealth liposomes*) sont recouverts d'un polymère qui permet d'augmenter la durée de vie des liposomes dans la circulation systémique. Le plus couramment utilisé est le (PEG), un polymère hydrophile qui se fixe à la surface des liposomes.

-les liposomes cationiques sont composés de phospholipides cationiques, c'est-à-dire chargés positivement. Ces liposomes sont utilisés notamment pour la délivrance de matériel génétique ;

-les immunoliposomes sont utilisés pour les applications pharmaceutiques. Ces objets ont à leur surface des anticorps ou des fragments d'anticorps pouvant directement être reconnus par leur cible.

Dans le domaine de la nutraceutique, les trois premières classes de liposomes énumérées ci-dessus peuvent être utilisées.

### Selon leur morphologie.

La morphologie fait référence à la taille des liposomes et au nombre de couches phospholipidiques qu'ils contiennent [183], comme indiqué dans la Figure 18. Ainsi, pour les objets ne contenant qu'une seule bicouche phospholipidique, on retrouve les *Small Unilamellar Vesicles* (SUV), dont la taille est inférieure à 80 nm, les *Large Unilamellar Vesicles*, de 200 nm à 400 nm et les *Giant Unilamellar Vesicles* (GUV, généralement supérieurs à 1 µM). Lorsque les objets sont composés de plusieurs bicouches phospholipidiques, ils prennent alors la dénomination de *Multivesicular Vesicle (MVV) ou Oligolamellar Vesicle* lorsque plusieurs vésicules sont piégées à l'intérieur d'une vésicule plus grande (l'objet est alors supérieur à 1 µm de diamètre), ou de *Multilamellar Vesicles (MLV)* lorsque les bicouches phospholipidiques sont concentriques.





Sigles	MLV	SUV	LUV	MVV
Dénominations	Multilamellar Vesicles	Small Unilamellar Vesicles	Large Unilamellar Vesicles	Multivesicular Vesicles
Représentations schématiques				
Tailles	400-2000nm	20-80nm	200-400nm	>1µm

Figure 18. Représentation schématique des différents types de liposomes [194]

## 2. Préparation et caractérisation des liposomes

### 2.1 Protocoles de formation des liposomes

#### *La matière première : les phospholipides*

Le choix des phospholipides utilisés pour la fabrication de liposomes est déterminant pour la taille des couches phospholipidiques, la charge de surface des objets produits, la rigidité et la fluidité des bicouches [195]. Ces molécules amphiphiles sont classées en deux grandes catégories : les glycérophospholipides, où le groupement alcool est un glycéride, et les sphingophospholipides contenant de la sphingosine. Ces groupements sont liés d'une part à un groupement phosphate (et constituent alors la partie hydrophile) et d'autre part à deux acides gras (partie lipophiles). Dans la fabrication des liposomes, les phosphoglycérides les plus couramment utilisés sont les phosphatidylcholines (qui représentent à titre d'exemple 70% des phospholipides de l'organisme).

La phosphatidylcholine, appelée également lécithine, est également utilisée comme émulsifiant dans l'industrie agro-alimentaire (code numérique E322). Ces phospholipides ont un groupement choline mais peuvent varier dans la nature des acides gras. On retrouve le plus généralement le 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), le 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), le 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), le Distearoylphosphatidylcholine (DSPC), le 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DLPC) et le 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DOPC), se différenciant les uns des autres par la longueur des chaînes acyles (nombre de carbones), le nombre d'insaturations (double liaisons) et la configuration (*cis*- ou *trans*-) [195–197].

#### *Formation naturelle des bicouches phospholipidiques*

Les phospholipides seuls étant très peu solubles dans l'eau, ils vont de ce fait s'assembler naturellement en bicouches phospholipidiques ; les queues lipophiles vont s'assembler pour se protéger du contact de l'eau et ainsi, les têtes hydrophiles seront en contact avec le milieu aqueux. Une fois les bicouches formées, les queues hydrophobes des bords du disque phospholipidique sont encore en contact avec le milieu aqueux, et y ont une énergie associée : le disque va donc automatiquement se refermer en vésicule sphérique : c'est la formation de liposome. A partir de là, des forces hydrodynamiques peuvent entraîner la fragmentation de la bicouche phospholipidique et la formation de liposomes de plus petite taille. Dans la plupart des cas, les disques phospholipidiques sont « empilés » parallèlement, et entraîne alors la formation de vésicules multilamellaires [198].

Il existe plusieurs méthodes de fabrication des liposomes, entraînant la formation d'objets de différentes tailles et différents degrés de lamellarité. Une fois les vésicules formées, ces deux caractéristiques peuvent être modifiées par différentes techniques physico-chimiques.

### *Hydratation sur couche mince (méthode de Bangham)*

L'hydratation sur couche mince, appelée *thin film hydration*, est la technique la plus répandue de fabrication des liposomes et sera utilisée dans ces travaux. Les phospholipides et autres composés hydrophobes sont dissous dans un solvant organique, généralement du chloroforme, du méthanol ou un mélange de ces deux solvants. Les solvants sont ensuite éliminés (flux d'azote ou lyophilisation) [199]. A ce stade, on peut alors parler de proliposomes. En effet, le stockage des liposomes hydratés ayant un impact négatif sur leur stabilité, le développement de proliposomes permet un stockage à plus long terme des futurs liposomes. La méthode d'hydratation (d'apport de la phase aqueuse qui permettra la formation des vésicules à partir des proliposomes) est une étape déterminante dans la fabrication des liposomes puisqu'elle va avoir un impact sur la taille et la lamellarité des objets :

- une hydratation dite « douce », ou *natural swelling*, du film phospholipidique durant quelques jours entraînera un gonflement naturel des disques et la formation de GUV mais également de MLV [198] ;
- une hydratation avec application de forces de cisaillement entraînera la formation de MLV [200] ;
- une hydratation avec flux hydrodynamique entraînera également la formation de MLV de tailles hétérogènes [198].

### *Électroformation*

Les empilements de bicouches phospholipidiques formés après évaporation des solvants seront déposés sur des électrodes et vont subir un champ électrique, généralement une alternance de courant direct / courant alternatif, ce qui entraînera la formation de GUV et MLV. Plusieurs paramètres viendront impacter la taille et le degré de lamellarité des objets formés, comme la température, le voltage, et la charge des phospholipides utilisés [201].

### *Formation des objets par injection de solvant organique*

Cette technique a l'avantage d'être rapide et ne nécessite que très peu d'étapes. Les phospholipides et autres composants hydrophobes sont dissous dans un solvant organique, comme l'éther, le méthanol ou l'éthanol. Après quoi, ils sont injectés dans un grand volume aqueux [199]. Les phospholipides au contact de la phase aqueuse vont alors former des vésicules pour limiter le contact des queues hydrophobes avec le milieu aqueux [202,203].

### *L'évaporation en phase inverse*

La fabrication de liposomes par la technique d'évaporation en phase inverse est utilisée pour l'encapsulation de composés hydrophiles. Après l'étape d'évaporation des solvants, les phospholipides sont re-dissous dans un autre solvant organique comme l'éther diéthylique. L'incorporation de la phase aqueuse et l'apport d'énergie, par ultra-sons par exemple, va alors provoquer la formation de micelles inversées ou d'émulsions eau-dans-l'huile [204]. Le solvant est alors évaporé lentement sous pression réduite pour générer les liposomes.



### *L'utilisation de détergents*

L'utilisation de détergents, appelés également tensio-actifs, permet l'encapsulation de molécules hydrophobes. Les tensio-actifs sont des molécules amphiphiles de nature synthétique (comme le Triton par exemple) qui ont la capacité de dissoudre à forte concentration les phospholipides. Les phospholipides sont tout d'abord dissous dans un milieu aqueux à l'aide de ces tensio-actifs : les deux entités vont alors former des micelles « mixtes ». Les tensio-actifs sont ensuite éliminés par différentes techniques (dialyse, séparation sur colonne, *etc*). A mesure que les tensioactifs sont éliminés, les micelles vont proportionnellement s'enrichir en phospholipides et naturellement former des liposomes [205].

### *Les fluides supercritiques*

L'état supercritique de la matière a été mis en évidence en 1822 par Charles Cagniard de La Tour, et est un état qui se situe entre le liquide et le gaz. La matière est considérée comme étant à l'état supercritique lorsqu'elle subit une température et une pression supérieures à sa température et sa pression critiques. Le fluide supercritique le plus communément utilisé est le CO<sub>2</sub> supercritique (scCO<sub>2</sub>). Il peut être utilisé pour deux objectifs distincts : pour solubiliser le soluté ou pour le faire précipiter (on appelle alors le scCO<sub>2</sub> l'anti-solvant) [206].

Dans la première méthode, le fluide est utilisé comme solvant ; une fois mélangé aux phospholipides, les changements de pressions et de température seront opérés afin de transiter l'état du fluide en état supercritique : les phospholipides vont alors s'arranger en bicouches [207]. La méthode de l'anti-solvant (*supercritical anti-solvent*) consiste à pulvériser du CO<sub>2</sub> dans le mélange phospholipide / phase organique et de faire varier la pression et la température. En atteignant son état supercritique, le scCO<sub>2</sub> va extraire les phospholipides tout en éliminant le solvant organique. Les phospholipides ainsi extraits dans la phase supercritique vont saturer cette phase et précipiter. Une hydratation permettra alors la formation des liposomes [206–208].

### *Techniques de modification de taille et de lamellarité des objets formés*

L'utilisation des fluides supercritiques dans la fabrication de liposomes permet d'obtenir une homogénéité recherchée dans la taille et la lamellarité des objets, mais la plupart des autres techniques ne le permettent pas. De ce fait, plusieurs techniques ont été développées dans le but de réduire ou augmenter la taille des objets, et de jouer sur le nombre de bicouches phospholipidiques qu'ils contiennent.

En suspension dans une solution aqueuse, les liposomes vont naturellement et progressivement augmenter de diamètre en fusionnant : c'est la coalescence. Par ailleurs, d'autres techniques permettent de faire varier la taille des objets : la sonication, par exemple, va faire diminuer les diamètres des liposomes. Cette technique a également un impact sur la lamellarité des objets : les liposomes en suspension vont s'entrechoquer, ce qui peut entraîner une déstabilisation des bicouches. La sonication est ainsi couramment utilisée pour passer d'objets multi-lamellaires à des objets unilamellaires. La méthode

d'hydratation / déshydratation ainsi que la méthode de congélation / décongélation (*freeze-thaw*) va également déstabiliser l'intégrité des bicouches et permettre la réorganisation des phospholipides.

Finalement, la technique la plus efficace est l'extrusion : la solution de liposome passe au travers d'un filtre composé d'une membrane (généralement en polycarbonate). La pression appliquée durant cette filtration et la taille des pores de la membrane sont des facteurs contrôlables qui permettent alors d'obtenir des objets avec une distribution de taille étroite [193,209].

## **2.2 Caractérisations physico-chimiques des liposomes**

L'analyse des caractéristiques physico-chimiques des liposomes formés est cruciale pour pouvoir catégoriser ces objets et s'assurer de leur homogénéité et de la validité des procédés de fabrication. Quatre grandes caractéristiques sont généralement déterminées lors de la fabrication de liposomes : la morphologie, la taille et distribution de taille des objets, la charge de surface (ou potentiel Zeta), ainsi que le taux d'encapsulation.

La morphologie désigne dans ce cas la forme des objets ainsi que leur degré de lamellarité. Elle se vérifie par des outils microscopiques, comme la microscopie optique qui permet de voir des objets supérieurs à environ 0,3  $\mu\text{m}$ , et qui, sous lumière polarisée, permet de s'assurer du caractère multi-lamellaire des liposomes grâce à leur biréfringence. Il existe également la microscopie à électronique à balayage qui demande une préparation d'échantillon plus complexe (comme la cryogénéisation dans le cas du Cryo-TEM) mais permet de visualiser le degré de lamellarité. Le caractère multilamellaire des objets peut également se vérifier par RMN du phosphore [193,199].

La taille et la distribution de taille des objets est également une donnée importante dans la fabrication des liposomes, notamment pour leur application : une augmentation de la taille des liposomes entrainera une augmentation de la clairance liposomiale par exemple. Il existe, ici encore, plusieurs méthodes pour mesurer ce paramètre : la mesure du changement de d'impédance électrique proportionnel au volume des objets (Compteur Coulter), la granulométrie, et enfin la spectroscopie de corrélation de photon, ou encore la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS). Cette technique se base sur la mesure des mouvements browniens que font naturellement les particules au contact du fluide dans lequel elles sont suspendues. Cette technique a l'avantage de pouvoir être utilisée pour des objets inférieurs à 1  $\mu\text{m}$ ; en revanche, elle n'est pas adaptée pour les populations polydisperses [195,198].

La charge de surface, ou potentiel Zeta, est un paramètre important à mesurer puisqu'il va apporter des informations cruciales sur le comportement des liposomes vis-à-vis de leur capacité à s'agréger notamment. Cette charge de surface est due aux interactions électrostatiques qui existent entre les liposomes et l'environnement proche de ces objets. Il varie selon la nature des phospholipides, la nature du milieu dans lequel les objets sont suspendus et de la molécule encapsulée, et influe sur la stabilité des objets. Ainsi, les liposomes à charge neutre auront une faible stabilité et une tendance à l'agrégation, contrairement aux objets chargés qui se repousseront. La valeur de la charge aura également des conséquences sur les interactions des liposomes avec les cellules : un liposome chargé négativement aura tendance à

subir des endocytoses quand un liposome chargé positivement va interagir par fusion avec les cellules. Cette charge de surface est mesurée par une sonde de champ électrique ou par mesure de la mobilité électrophorétique (laser Doppler) et est exprimée en millivolts [193,198,210].

Enfin, le dernier paramètre important est le taux d'encapsulation des objets formés. Il est question ici de déterminer quel est le pourcentage de molécules bioactives introduites qui ont été effectivement encapsulées.

Le calcul de ce taux d'encapsulation correspond au rapport entre la concentration en composés encapsulés sur la concentration en composés totale, multiplié par un facteur 100 :

$$\text{Taux d'encapsulation (\%)} = \frac{[\text{molécule encapsulée}]}{[\text{total introduit}]} \times 100$$

La difficulté dans le calcul du taux d'encapsulation réside dans la détermination de la concentration en molécules effectivement encapsulées. Cela nécessite de séparer les liposomes contenant la molécule du milieu de suspension contenant les molécules non-encapsulées, et il existe principalement 3 méthodes pour y parvenir [210,211] :

- la dialyse, bien qu'étant une technique nécessitant du temps, permet de séparer par diffusion au travers d'une membrane poreuse spécifiquement choisie les molécules non-encapsulées, et a été de nombreuses fois utilisée pour séparer le resvératrol non encapsulé du resvératrol encapsulé dans les liposomes [212–214] par exemple ;
- la centrifugation (pour des objets supérieurs à 1 µm [215,216]) et l'ultra-centrifugation permettent de faire précipiter les liposomes ;
- la filtration sur gel sépare les liposomes des molécules non-encapsulées en jouant sur les caractéristiques du gel et des éluants [217–219].

Le calcul du taux d'encapsulation permet également de déterminer d'autres paramètres des liposomes produits, comme la stabilité de stockage. En effet, un suivi de l'évolution du taux d'encapsulation dans le temps d'une suspension de liposomes permettra de déterminer la cinétique de fuite des molécules encapsulées.

### **2.3 Les liposomes multilamellaires de type oignon**

#### 2.3.1 Généralités

La fabrication et la caractérisation des liposomes multilamellaires de type oignon est relativement récente, puisque c'est l'équipe de Didier Roux (France) qui a développé la première technique de fabrication de ces objets et publié en 1993 [220]. Les liposomes multilamellaires de type oignon sont également appelés vésicules multilamellaires de type oignon ou encore sphérulites®. A la différence des MLVs classiques, l'enchainement des couches phospholipidiques concentriques se poursuit jusqu'au cœur des objets, diminuant ainsi la taille du cœur aqueux. Le développement de ces nouveaux objets (nanoscopiques ou microscopiques) a fait suite à l'étude du comportement des phases lamellaires lyotropiques sous l'action des forces de cisaillement [221]. En effet, l'application de forces de cisaillement (*shear stress*) sur une phase lamellaire constituée de phospholipides entraîne la formation de sphères

phospholipidiques concentriques. Les sphérulites ont ensuite été développés par une *start up* de la Région de Bordeaux (Capsulis) dans le but de développer des actifs encapsulés pour une application dans les domaines vétérinaires et cosmétiques [222]. Depuis cette date, plusieurs publications ont visé à étudier l'impact des conditions de fabrication sur leurs caractéristiques.

### 2.3.2 Fabrication

Les grandes étapes de fabrication des sphérulites® que nous avons utilisées au cours de ces travaux sont proches de celles des liposomes classiques : dissolution des phospholipides avec tensioactifs, évaporation des solvants utilisés, phase d'hydratation (Figure 19). La principale différence est l'application d'une force de frottement pour la production d'objets multilamellaires. De ce fait, plusieurs facteurs influenceront les caractéristiques physico-chimiques des objets formés.

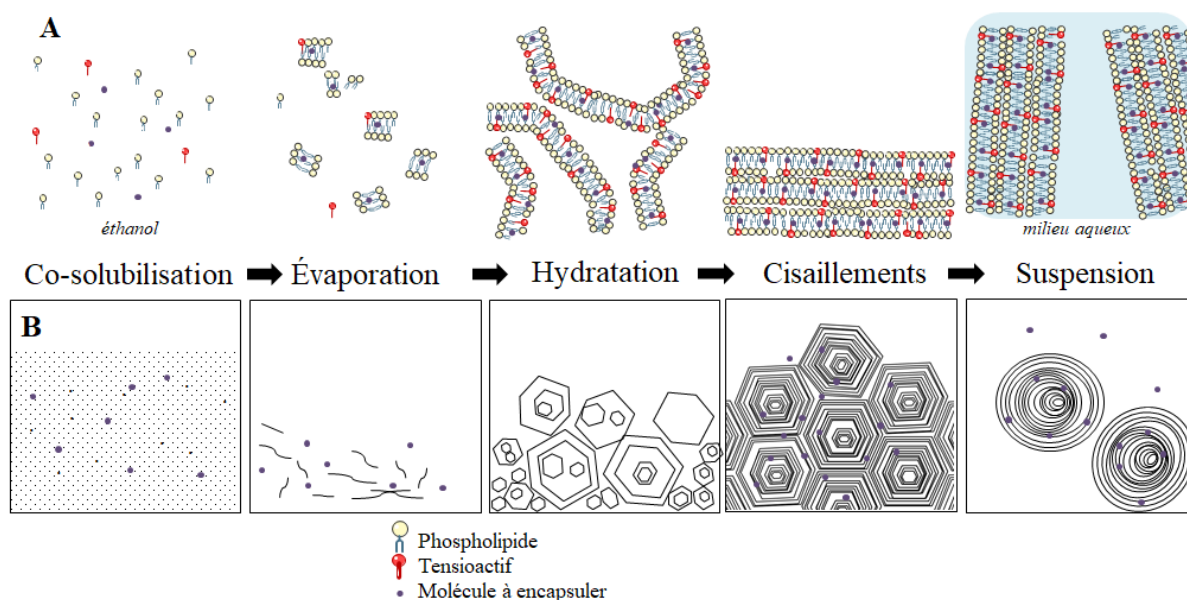


Figure 19. Principales étapes de fabrication des liposomes multilamellaires de type oignons pour encapsuler une molécule hydrophobe à l'échelle moléculaire (A) ou microscopique (B). Cas de l'application des forces de frottement par cisaillement. Après co-solubilisation des différents composants et évaporation des solvants, l'apport d'eau va entraîner la formation de liposomes multi-vésiculaires qui, après application de forces de frottement, vont former des liposomes multilamellaires de type oignon.

Dans un premier temps, la nature des composants utilisés aura des conséquences sur la taille et la charge des objets. La lécithine de soja ou d'œuf est généralement utilisée, avec ajout éventuel d'un tensioactif [222]. Le choix des phospholipides et tensioactifs utilisés est crucial : le ratio tensio-actif / phospholipide aura des conséquences sur la taille des objets [223], comme la récemment démontré Touti *et al.* (2020), ainsi que sur le taux d'encapsulation [224]. La fabrication de sphérulites® recouvert de polyéthylène glycol peut augmenter leur stabilité [225], et la nature des phospholipides influence la charge [223]. Enfin, plusieurs paramètres peuvent faire varier l'élasticité des objets, qui est une caractéristique clé notamment pour un développement d'objets à application cutanée [223,226].

Dans un second temps, les protocoles utilisés seront déterminants dans les caractères physico-chimiques des liposomes formés. Ainsi, l'étape d'hydratation est cruciale : la variation de la quantité de phase aqueuse ajoutée lors de la phase de cisaillement a un impact sur la taille des objets formés [223]. Enfin, le temps d'hydratation est important dans la mesure où l'eau va diffuser lentement dans les phases lipidiques [222]. Une fois l'hydratation réalisée, la force, la vitesse et la durée des forces de cisaillement auront des conséquences sur la polydispersité, la taille et le taux d'encapsulation des objets [227]. Ces forces de cisaillement sont généralement réalisées à l'aide d'un dispositif fait maison de type cellule Couette (les phases lamellaires sont ici insérées entre deux cylindres, l'un statique et l'autre en rotation) ou d'une spatule [200,223].

### 2.3.3 Caractérisation et avantages des sphérulites

La caractérisation de la taille, de la charge et du taux d'encapsulation des sphérulites nécessite les mêmes outils et techniques que pour les liposomes classiques [200]. La principale différence réside dans la caractérisation des propriétés morphologiques des objets, à savoir les caractères multilamellaire et concentrique.

En lumière polarisée, l'empilement des bicouches phospholipidiques de façon concentrique ainsi que leur biréfringence ont la propriété de former des croix de Malte visibles au microscope [200,228] (Figure 20, A). Pour confirmer la multi-lamellarité, la diffraction par rayons X peut également être utilisée [228]. Afin de s'assurer que cet empilement concentrique atteigne le cœur des objets, la cryo-microscopie électronique peut être utilisée (Figure 20, B).

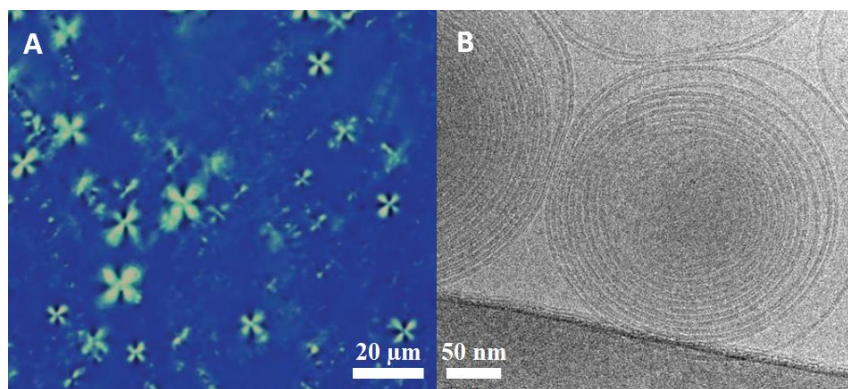


Figure 20. Observation des sphérulites en microscopie à lumière polarisée (A) et Cryo-TEM (B).

(C. Faure, données personnelles avec permission)

Les liposomes multi-lamellaires de type oignons présentent de nombreux avantages, notamment en nutraceutique, en plus des avantages de l'encapsulation de manière générale (amélioration de la stabilité, de la biodisponibilité, *etc.*). La présence de bicouches phospholipidiques permet l'encapsulation de composés hydrophiles, hydrophobes, amphiphiles mais également la co-encapsulation de composés initialement incompatibles, permettant la délivrance simultanée de deux molécules potentiellement synergiques. Le nombre de bicouches phospholipidiques (jusqu'au cœur des objets dans le cas des sphérulites®) permet d'augmenter

considérablement le taux d'encapsulation des composés. Enfin, la fabrication des liposomes multi-lamellaires est relativement simple pour une application à l'échelle industrielle.

#### 2.3.4 Encapsulation dans les sphérulites®

L'enchaînement des bicouches phospholipidiques constituées de molécules amphiphiles comme expliqué précédemment permet l'encapsulation de composés hydrophiles et hydrophobes. Dans le cadre d'encapsulation de composés hydrophobes, l'avantage des sphérulites est l'augmentation du taux d'encapsulation de ces composés. En effet, l'augmentation du nombre de bicouches phospholipidiques augmente le ratio phospholipides / eau des objets, permettant ainsi l'encapsulation d'un plus grand nombre de composés hydrophobes.

Il est par conséquent possible d'encapsuler une grande diversité de composés. Freund *et al.* (2000), ont ainsi encapsulé la protéine A (issu de *Staphylococcus aureus*) dans des sphérulites composées de lécithine, cholestérol et polyoxyéthylène. Les objets formés avaient alors un diamètre de 300 nm et présentaient une forte stabilité dans un modèle *in vitro* de milieu gastro-intestinal, à l'exception de la bile [227]. En fabriquant des sphérulites® radioactifs et en les administrant par voie intraveineuse et orale à des rats, ils ont également montré l'accumulation des objets dans le foie et la rate notamment, avec une stabilité bien supérieure à celle des liposomes unilamellaires [229].

Quelques années plus tard, Mignet *et al.* (2013) ont encapsulé des oligonucléotides dans deux préparations différentes de sphérulites et ont pu atteindre un taux d'encapsulation de 80% pour les objets fabriqués à partir de lécithine, d'eau, d'oléate macrogol et de dioleoyl-phosphatidylethanolamine. Les sphérulites ainsi formées étaient monodisperses et avaient un diamètre moyen de 300 nm. L'encapsulation d'oligonucléotides a montré jusqu'à 100% de transfection de ces molécules sur des lignées cellulaires [230]. La technique de fabrication des sphérulites a également été utilisée pour l'encapsulation de la glucose oxydase [231] et de photosensibilisateurs [215]. La technique d'encapsulation dans les oignons également été appliquée à l'encapsulation de nanoparticules magnétiques [232].

Enfin, l'encapsulation dans les sphérulites de molécules naturelles est d'un grand intérêt pour permettre l'augmentation de leur stabilité, et de leur biodisponibilité. En préparant des sphérulites contenant de la rutine et de la naringénine, Kerduro *et al.* (2014), ont obtenu un taux d'encapsulation de 80% (la rutine et la naringénine étaient encapsulées et adsorbées par les sphérulites, respectivement) et ont démontré l'effet protecteur de cette encapsulation sur la dégradation de la rutine [233].

L' $\epsilon$ -viniférine quant à elle, a également été incorporée dans des liposomes multilamellaires de type oignons contenant de la lécithine, du Tween80 et de l'eau. Les objets ainsi formés avaient un diamètre de 322 nm suivant une répartition monodisperse, un potentiel Zeta de  $-46 \pm 2$  mV et un taux d'encapsulation de  $58 \pm 3\%$ . Dans cette étude, il a également été

montré que l'encapsulation de ce dimère du resvératrol augmentait sa solubilité dans l'eau, et diminuait sa photosensibilité, augmentant ainsi sa stabilité [200].

### 3. L'encapsulation des stilbènes

Plusieurs revues disponibles sur les bases de données scientifiques résument l'intérêt de l'encapsulation des polyphénols sur la stabilité, la biodisponibilité et les activités biologiques de ces composés [234]. Dans cette partie seront résumées de manière non exhaustive les principales conséquences de l'encapsulation du resvératrol selon des études *in vitro* (études physico-chimiques ou sur modèles cellulaires) *et vivo* sur modèle animal [183].

#### 3.1 Intérêts de l'encapsulation montrés à l'aide d'expérimentations *in vitro*

Les conséquences de l'encapsulation du resvératrol mesurées *in vitro* peuvent se distinguer en trois parties :

- les propriétés physico-chimiques. En effet, l'encapsulation du resvératrol permet d'augmenter sa solubilité en milieu aqueux [235,236] ou bien encore de limiter son isomérisation [213,237].

- la stabilité et la bioaccessibilité du resvératrol. La diminution de l'isomérisation et donc de la photodégradation du resvératrol permet d'augmenter sa bioaccessibilité. Concernant le dimère qui fait l'objet de ces travaux de thèse, l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans des liposomes multilamellaires de type oignons a récemment été développée, et cela a permis de mettre en évidence une augmentation de la photostabilité de ce composé [200]. Parallèlement, certaines études tendent à mesurer la stabilité des objets produits au contact de milieux modèles mimant les conditions physico-chimiques du tractus gastro-intestinal. Ainsi, après avoir encapsulé le resvératrol dans des nanoparticules lipidiques solides, Neves *et al.* (2013), ont montré que les objets formés étaient stables en milieu modèle gastrique (pH 1.2) et commençaient à se dégrader (fuite du resvératrol) en milieu modèle intestinal (pH 7.4) [190]. Certaines études ont utilisé des modèles cellulaires afin de mesurer l'absorption du resvératrol et sa potentielle internalisation cellulaire après encapsulation. L'encapsulation dans des liposomes permet par exemple d'augmenter la concentration cellulaire en resvératrol des 3T3-L1, une lignée cellulaire de pré-adipocytes [237], et l'encapsulation dans des nanoparticules de PLGA engendre une augmentation de la concentration intracellulaire des HepG2, des cellules issues du tissu hépatique [238]. Enfin, la culture de cellules Caco2 (entérocytes), permet de mesurer le passage baso-latéral de composés à travers ces cellules : Sessa *et al.* (2014), ont ainsi montré une augmentation de la rapidité de passage à travers une monocouche de cellules Caco2 du resvératrol encapsulé par émulsion [239].

- les propriétés biologiques. En effet, la comparaison des propriétés biologiques du resvératrol sous sa forme libre et sa forme encapsulée permet également de mettre en évidence les conséquences de l'encapsulation. L'encapsulation du resvératrol en comparaison à sa forme

libre augmenterait ses propriétés de diminution d'accumulation des lipides sur cellules HepG265, ou encore augmenterait le phénomène de brunissement des cellules 3T3-L1 [237] (propriétés anti-adipogéniques). De plus, l'encapsulation du resvératrol a également montré un intérêt certain dans l'inhibition de la croissance cellulaire de lignées tumorales, comme HeLa, HepG262 ou encore HCPC-I63, montrant ainsi que l'encapsulation permettait d'augmenter les propriétés biologiques du resvératrol en le rendant plus accessible aux cibles. Concernant les liposomes multi-lamellaires de type oignons, il a récemment été démontré que l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine diminuait la toxicité de cette molécule sur la lignée cellulaire Caco-2 [200].

### 3.2 Intérêts de l'encapsulation montrés à l'aide d'expérimentations *in vivo*

Les études *in vivo* qui tendent à mesurer les effets de l'encapsulation du resvératrol sont peu nombreuses. Un tableau non exhaustif résume les différentes études sur modèles animaux (tableau 5). La plupart de ces études visent à comparer les paramètres pharmacocinétiques après administration de la molécule sous sa forme encapsulée et sous sa forme libre. Parmi les différences redondantes, l'encapsulation a pour effet :

- l'augmentation de la concentration plasmatique maximale : après administration orale, le resvératrol est retrouvé en plus forte concentration lorsque celui-ci a été administré sous sa forme encapsulée (ce qui a également été rapporté pour d'autres composés comme la curcumine [245,246] ou la quercétine [247]). C'est le cas par exemple dans l'étude de Yen *et al.* (2017), qui ont mesuré un  $C_{max}$  deux fois plus élevé dans le plasma des rats après administration d'une émulsion contenant du resvératrol [248]. On retrouve également cette tendance dans d'autres études, après encapsulation du resvératrol dans des liposomes [218], des nanoparticules [249] ou encore après coacervation [250].

- l'augmentation du temps durant lequel la concentration plasmatique atteint son maximal : le  $T_{max}$  est en effet augmenté dans la plupart des études utilisant l'administration par voie orale [251].

- l'augmentation du temps de résidence moyen de la molécule dans la circulation systémique (MRT) [251].

De plus, le resvératrol tend également à s'accumuler davantage dans les tissus après administration sous forme encapsulée. Ainsi, Narayanan *et al.* (2009), ont montré une concentration en resvératrol supérieure dans le tissu prostatique après administration de la forme encapsulée [252]. Après administration par voie intrapéritonéale, le resvératrol tend à s'accumuler davantage dans le cerveau, le foie et les reins quand il a été administré encapsulé dans des nanocapsules [253], et s'accumule également de manière plus importante dans un tissu tumoral [218].

L'augmentation des concentrations plasmatiques maximales après administration par voie orale indique une amélioration de la biodisponibilité du resvératrol [248] et de ses activités biologiques. Narayana *et al.* (2009), ont ainsi montré que l'encapsulation du resvératrol dans des liposomes permettait la diminution d'adénocarcinome prostatique après administration par



voie orale, et ce de manière plus significative que lorsque le resvératrol n'est pas encapsulé [252]. L'encapsulation de cette molécule permet également une diminution de l'inflammation [249], une augmentation de ses propriétés anti-fatigue chez le rat [248] ou encore une diminution des lésions intestinales qu'elle provoque [253].

Les études *in vivo* concernant l'encapsulation du resvératrol et ses conséquences témoignent de l'intérêt certain de cette technique d'administration pour améliorer la biodisponibilité de ce composé et par extrapolation, des composés de la famille des stilbènes ayant une très faible biodisponibilité. En plus de protéger le composé de sa dégradation, l'encapsulation permettrait d'augmenter l'absorption intestinale, et ainsi augmenter la concentration du composé dans l'organisme, et par conséquent son activité biologique. Bien que ces études aient été menées exclusivement sur les rongeurs, des études cliniques de phase I ou de phase II affirment que les bénéfices de l'encapsulation du resvératrol se retrouvent chez l'homme, que ce soit sur les paramètres pharmacocinétiques [139] ou sur les propriétés biologiques [254]

Tableau 5. Encapsulation du resvératrol et études *in vivo*

Objet/Méthode de fabrication	Composition	Caractérisation	Animal / Dose / Administration	Effets	Référence
<b>Liposome</b>	Lécithine	Non renseigné	Souris 50 mg/kg Gavage	Augmentation de la concentration en Rsv dans le sérum et le tissu prostatique Diminution de l'adénocarcinome prostatique	[252]
<b>Nanocapsule avec corps lipidique</b>	poly( $\epsilon$ -caprolactone), triglycérides caprique/caprylique et sorbitan monostéarate	241 $\pm$ 7 nm -14.1 $\pm$ 2.3 mV 99.89 $\pm$ 1.3% EE	Rat 5 mg/kg intrapéritonéal (14j)  Gavage	Augmentation par 2 de la concentration dans le cerveau, le foie et les reins  Lésions intestinales moindres	[253]
<b>Emulsion (radioactif)</b>	Amylose de maïs, sodium caséinate et glucose	Distribution bi-modale	Rat 0.23mg gavage	Augmentation de la radioactivité dans le sang et le foie Augmentation de la stabilité dans le petit intestin	[134]
<b>Liposome, évaporation-diffusion</b>	Lécithine, acide stéarique	134 $\pm$ 7.6 nm -34.3 $\pm$ 2.5 mV 88.9 $\pm$ 3.1% EE	Rat 20mg/kg gavage	Augmentation Tmax, Cmax, AUC 0- $\infty$ et MRT augmentés	[251]
<b>Liposomes multilamellaires, méthode pro-liposomes</b>	DSPC avec ou sans cholestérol	108.4 nm 97.22% $\pm$ 2.31%	Rat 50 mg/kg gavage	Augmentation Tmax et AUC <sub>0-6h</sub> Cmax forme native, ratio formes native / glucuronidée,	[255]
<b>Nanoparticules, évaporation de solvant puis spray-drying</b>	Zéine (protéine), lysine, sodium ascorbate	307 $\pm$ 3 nm -51.1 $\pm$ 1.55 mV 82.1 $\pm$ 4.12	Rat 15 mg/kg gavage ou intraveineux	Comparaison à encapsulation conventionnelle : augmentation AUC et Cmax Diminution de la concentration en TNF- $\alpha$ plasmatique après induction de l'inflammation	[250]

<b>Liposome, <i>thin film hydration puis sonication</i></b>	Lécithine, cholestérol avec ou sans D- $\alpha$ -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 succinate	De 64.5 $\pm$ 5.56 à 238.9 $\pm$ 35.04 nm De 0.03 $\pm$ 0.02 à -2.1 $\pm$ 0.76 mV	Rat 2 mg/kg intraveineux		Augmentation AUC (x 29), T <sub>1/2</sub> , MRT Augmentation de l'accumulation de resvératrol dans le cerveau (x 10)	[256]
<b>Liposome (co-encapsulation Paclitaxel), <i>thin film hydration</i></b>	Lécithine, DSPE-mPEG200	50 nm 92 $\pm$ 3%	Souris (résistantes) 20 mg/kg intraveineux	MCF-7/Adr	Augmentation de l'accumulation de resvératrol dans la tumeur Augmentation par 10 de l'AUC plasmatique	[218]
<b>Emulsion huile dans eau</b>	Capryol 90, Cremophor EL, Tween20	Entre 18.9 et 44.8 nm	Rat 50 mg/kg gavage		Augmentation par 2 du C <sub>max</sub> et de l'AUC, biodisponibilité 3 fois supérieure Amélioration des propriétés anti-fatigue (durée de nage)	[248]
<b>Co-acervation et spray-drying</b>	Caséine	200 nm -19 $\pm$ 1 mV 68% EE	Rat 15 mg/kg gavage		Augmentation C <sub>max</sub> et T <sub>max</sub>	[250]
<b>Nano-particules, diffusion de solvant</b>	PLGA, N-oleoyl-d-galactosamine et Tween 80	108.4 nm 97.22% $\pm$ 2.31%	Rat 40 mg/kg, gavage		Augmentation C <sub>max</sub> et biodisponibilité relative	[257]

## *Objectifs de la thèse*

En se basant sur les données bibliographiques et les précédentes études menées au sein du laboratoire, les objectifs principaux de ce travail de thèse avaient pour buts :

- l'**encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine** dans des liposomes multilamellaires ;
- la production par **hémisynthèse** des métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine ;
- l'étude de l'impact de l'encapsulation sur les **paramètres pharmacocinétiques, le métabolisme et la distribution tissulaire** de l' $\epsilon$ -viniférine après administration orale chez le rat ;
- la détermination des **activités biologiques des métabolites glucuronidés** sur modèles cellulaires.

L'organisation générale des différents volumes de cette thèse est représentée en Figure 21.

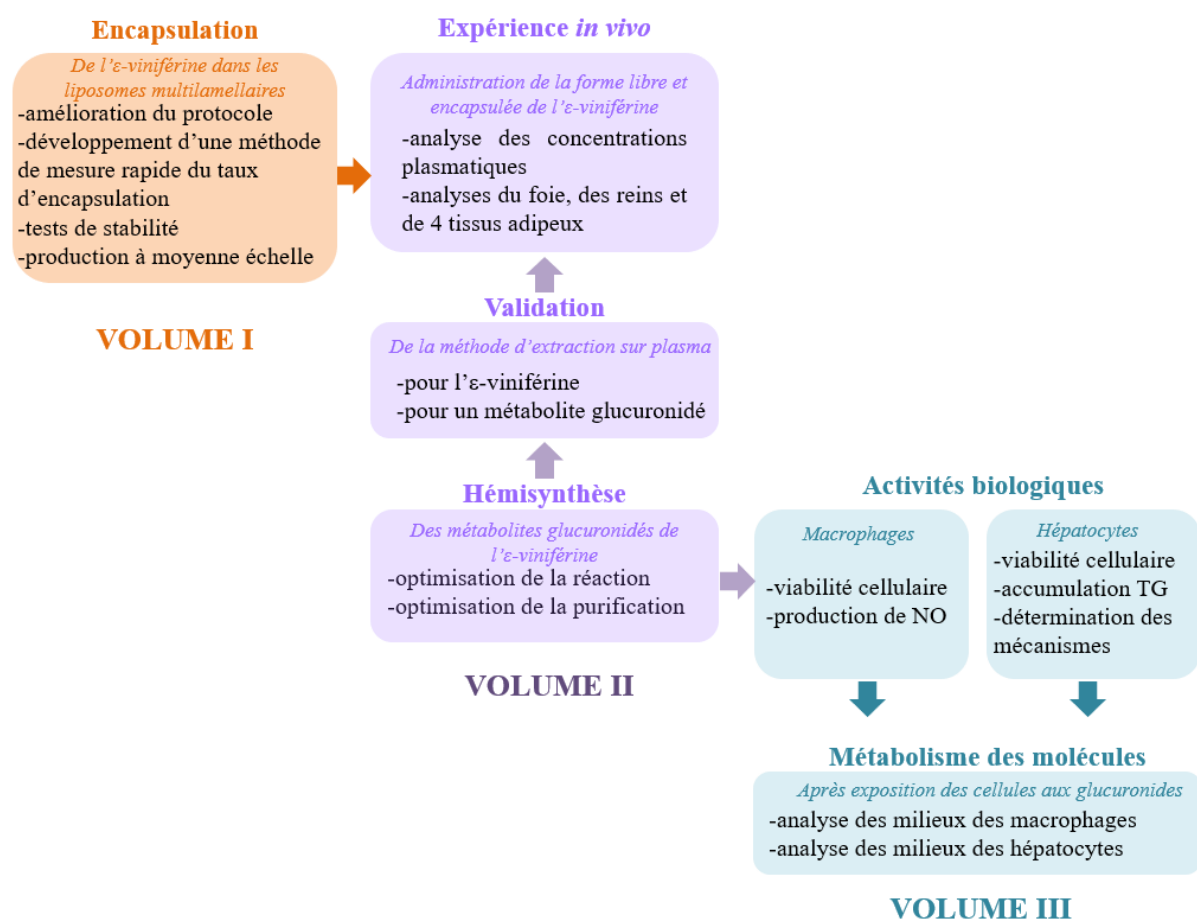


Figure 21. Organisation générale de la thèse

Dans un premier temps, l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine, s'est réalisée en collaboration avec le centre de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-Objets, et avait plusieurs objectifs :

- **améliorer le taux d'encapsulation** de l' $\epsilon$ -viniférine ;
- **mesurer le taux d'encapsulation** de façon simple et rapide ;
- **tester la stabilité** des objets formés.

Ensuite, l' $\epsilon$ -viniférine ainsi encapsulée a permis de réaliser une expérimentation chez l'animal. Cette expérience *in vivo* représente le cœur du deuxième volume de cette thèse. Dans ce volume, l'objectif principal était divisé en plusieurs parties :

- optimiser les paramètres de **production des métabolites glucuronidés** par hémisynthèse ;
- produire à moyenne échelle les métabolites glucuronidés et les **purifier** ;
- **valider la méthode** d'extraction de l' $\epsilon$ -viniférine et d'un glucuronides sur plasma ;
- réaliser l'**étude *in vivo* chez le rat** et déterminer les paramètres pharmacocinétiques ;
- doser l' $\epsilon$ -viniférine et ses métabolites glucuronidés dans **les tissus** suivants : le foie, les reins et 4 tissus adipeux.

Dans le troisième et dernier volume, il était question de mesurer les potentielles propriétés biologiques des métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine grâce à leur production en hémisynthèse. Cette partie est divisée en trois axes principaux :

- étudier l'impact des glucuronides sur **l'accumulation de triglycérides dans un modèle *in vitro* de stéatose hépatique** ;
- mesurer les **activités anti-inflammatoires** de ces métabolites sur des macrophages ;
- déterminer les potentielles **biotransformations** des composés testés au contact des lignées cellulaires.

Dans un contexte de valorisation d'extraits végétaux pour la santé humaine, ces expériences visent à mieux comprendre le devenir de l' $\epsilon$ -viniférine dans l'organisme et émettre des hypothèses quant aux molécules responsables de ses activités biologiques.



# **Volume I**

*Encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les  
liposomes multilamellaires*



## **Introduction**

Il a été démontré dans plusieurs articles scientifiques que l'encapsulation de composés dans des liposomes améliorerait certains paramètres pharmacocinétiques de ces composés après administration chez l'animal et augmentait la biodisponibilité de ces molécules [186,242,250,253]. De plus, comme cela a été mentionné dans l'introduction générale, l'utilisation MLLs permet d'encapsuler un plus grand nombre de molécules que des liposomes unilamellaires et a l'avantage de pouvoir encapsuler des molécules hydrophiles, lipophiles et amphiphiles [198,200,224,227]. C'est pour ces raisons que l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs nous a semblé une piste intéressante dans le but d'améliorer la biodisponibilité de ce stilbène.

Cette encapsulation a déjà été réalisée au laboratoire, en collaboration avec le CBMN de Bordeaux. L'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine par la méthode de l'hydratation sur couche mince et après application de forces de frottement amène à la formation de MLLs de type oignons [200].

Cependant, après fabrication des MLLs, plusieurs paramètres sont nécessaires à déterminer : la taille, la charge de surface, la morphologie (lamellarité) et le taux d'encapsulation. Pour mesurer ce dernier, les principaux protocoles conventionnels sont coûteux, en termes de temps et/ou d'équipement, et ne semblent donc pas adaptés à toutes les expériences. De ce fait, le développement d'une méthode rapide et peu coûteuse semble être nécessaire.

Enfin, la stabilité des MLLs peut être déterminées dans différentes matrices *in vitro* [254]. Il existe par exemple des milieux modèles mimant les conditions gastriques et intestinales, ou encore des fractions subcellulaires permettant de mimer les conditions physiologiques, et ainsi de déterminer les conséquences de l'encapsulation sur la stabilité et les potentielles biotransformations de la molécule [140].

## **Objectifs**

Dans cette partie, nous avons souhaité améliorer la production des MLLs et déterminer leur stabilité. Ce travail a nécessité plusieurs étapes.

Dans un premier temps, le protocole d'**encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine a été optimisé** en vue d'améliorer son taux d'encapsulation [200].

Après avoir caractérisé les liposomes formés en termes de taille, morphologie et charge, le développement d'**une nouvelle méthode de séparation de l' $\epsilon$ -viniférine non-encapsulée** des MLLs a été réalisé.

Enfin, la stabilité des MLLs a été déterminée dans différentes conditions : en suspension aqueuse et au contact de matrices biologiques telles que des fractions hépatiques de rats et d'humains (métabolisme *in vitro*).

## 1. Amélioration de la fabrication des MLLs et mesure du taux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine

L'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les liposomes multilamellaires a été réalisée au laboratoire par la méthode classique de préparation des MLLs de type oignons à savoir le cisaillement d'une phase lamellaire [200]. Cette technique, a permis d'atteindre un taux d'encapsulation de  $58 \pm 3\%$ . Un des objectifs de ce volet de thèse est d'améliorer le taux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine. Après avoir fabriqué les objets, ils ont été caractérisés dans le but de comparer les différentes productions de MLLs.

### 1.1 Protocole de fabrication et de caractérisation des MLLs

La fabrication de ces objets s'est déroulée selon plusieurs étapes décrites ci-dessous.

**La Solubilisation** : la lécithine de soja utilisée (P75, de 68% à 74% de phosphatidylcholine et lyso-phosphatidylcholine, ainsi que 7% à 11% de phosphatidylethanolamine, Lipoid GmbH, Allemagne) a été préalablement solubilisée dans l'eau Milli-Q et lyophilisée, et pesée afin de mesurer une masse exacte qui représente entre 52,5% et 56,5% de la masse totale des liposomes, selon le pourcentage d' $\epsilon$ -viniférine incorporé souhaité. Le tensio-actif (Tween80, Sigma-Aldrich) a également été pesé et représente 11,5% de la masse totale. Enfin, l' $\epsilon$ -viniférine a été pesée, et toujours gardée à l'abri de la lumière. Ces trois composants ont ensuite été individuellement solubilisés dans l'éthanol ultrapure.

**La co-solubilisation** : dans notre cas, la molécule à encapsuler est lipophile, et doit donc être ajoutée au même moment que les composés lipidiques. Une fois les trois composants individuellement solubilisés, ils ont été réunis, l'éthanol évaporé par séchage sous flux d'azote, puis l'échantillon a été lyophilisé.

**L'hydratation** : dans ces travaux, nous avons fixé le pourcentage d'eau à 38% de la masse totale de la préparation, puisque c'est ce pourcentage qui a permis d'obtenir le meilleur taux d'encapsulation [200]. La poudre constituée des phospholipides, du tensio-actif et de l' $\epsilon$ -viniférine a été précisément pesée dans une fiole de cisaillement afin de calculer le volume exacte d'eau à ajouter pour qu'il représente 32% de la masse finale.

**Les cisaillements**. Les forces de frottement sont appliquées par cisaillement à l'aide d'une spatule. Avec cet outil, la « pâte » formée des constituants a été écrasée sur les parois de la fiole de cisaillement. La spatule fut utilisée de façon circulaire durant 5 minutes. Une légère centrifugation a été appliquée durant 5 min à 2000 rpm. Ce cycle [cisaillement + centrifugation] a été réalisé 3 fois, avant de placer les liposomes à 4 °C durant 24 heures. Après ces 24 heures, 3 cycles [cisaillement + centrifugation] ont été réitérés. A la fin de ce protocole, les liposomes multilamellaires se sont formés et se retrouvent au contact les uns des autres. L'ajout d'un excès d'eau a permis de les désolidariser les uns des autres (Figure 22).

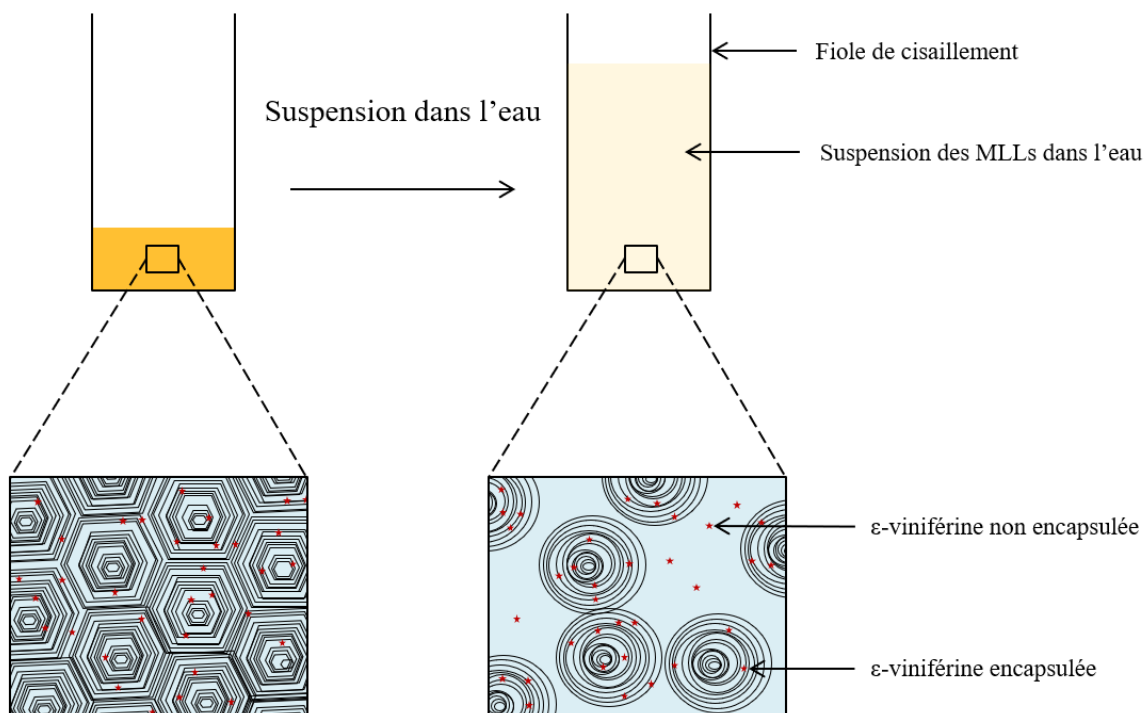


Figure 22. Représentation des MLLs avant et après suspension dans l'eau. L'apport d'eau en excès permet de séparer les différents MLLs les uns des autres.

Une fois les objets formés, ils ont été caractérisés selon différents paramètres. Trois analyses, à savoir, la microscopie, la DLS et le potentiel zêta permettent de déterminer la morphologie, le diamètre et la disparité, ainsi que la charge de surface des objets formés, respectivement. Ils sont détaillés ci-dessous. Un quatrième paramètre, la détermination du taux d'encapsulation, sera détaillé dans le paragraphe 1.3.

**La microscopie** a été réalisée sur un appareil Olympus BX51. Les MLLs ont été analysés de deux façons. Une suspension à 1 mg/mL de MLLs dans l'eau Milli-Q a été réalisée pour observer les objets en microscopie optique. A l'état de « pâte » (Figure 22, gauche), les MLLs ont été observés en microscopie en lumière polarisée.

**La DLS**, via un analyseur de tailles de particules (Appareil Vasco, Cordouan Technologies Ltd., Pessac, France), a été utilisé pour mesurer le diamètre des objets. Pour ce faire, une suspension des MLLs à 1 mg/mL d'eau Milli-Q a été réalisée. Les indices de réfractifs des liposomes (1,45) et de l'eau (1,33) ont été préalablement renseignés dans le logiciel afin de déterminer le diamètre des objets grâce à l'intensité de la lumière diffusée par les particules.

**Le potentiel Zeta**, la charge électrique de surface des objets a été mesurée à l'aide d'un ZetaSizer Nano Serie (Malvern, France). Une suspension à 1 mg/mL des objets a été réalisée dans l'eau MilliQ, puis placée dans une cellule zêta à capillaires repliés. L'indice de réfraction du dispersant (l'eau, 1,33) et du composant principal (lécithine, 1,45) ont été préalablement

enregistrés dans le logiciel pour mesurer le potentiel zêta. Trois acquisitions minima ont été réalisées.

### 1.2 Amélioration de la fabrication des MLLs

L'amélioration de la fabrication des MLLs s'est faite en modifiant deux étapes.

Nous avons, tout d'abord, modifié l'étape d'hydratation qui se faisait initialement en un seul ajout de 32 % d'eau. Ainsi, après avoir pesé précisément la poudre des autres constituants, 16% d'eau ont été ajoutés à la préparation, et des cisaillements sont appliqués durant une minute avant d'ajouter les 16% d'eau restants. Cet apport d'eau en deux étapes a permis de favoriser la formation de liposomes multilamellaires. En effet, selon l'étude de Crauste-Manciet et al. 2013 [228], l'incorporation de l'eau de manière fractionnée augmente la formation de liposomes multilamellaires par comparaison aux unilamellaires.

Puis, le pourcentage d' $\epsilon$ -viniférine introduite dans les préparations a été optimisé afin de déterminer le pourcentage optimal, c'est-à-dire celui qui permettrait d'encapsuler la plus grande quantité d' $\epsilon$ -viniférine sans détériorer la morphologie des objets. Trois productions ont été réalisées, à 3%, 6% et 9%. Après mesure du diamètre moyen en DLS, il s'est avéré que l'augmentation du pourcentage d' $\epsilon$ -viniférine incorporé engendrait une légère augmentation du taux d'encapsulation, mais également une augmentation du diamètre moyen des objets (résultats non présentés). En testant des productions à 4% de la molécule, il s'est avéré que les diamètres n'étaient pas significativement différents des objets préparés à partir de 3% d' $\epsilon$ -viniférine. De ce fait, nous avons fixé à 4% la proportion d' $\epsilon$ -viniférine introduite dans les futures préparations.

Chaque production a été analysée au microscope optique et sous lumière polarisée. Comme indiqué en Figure 23, la présence de croix de Malte causée par les phénomènes de biréfringence témoigne de la multi-lamellarité des objets formés.

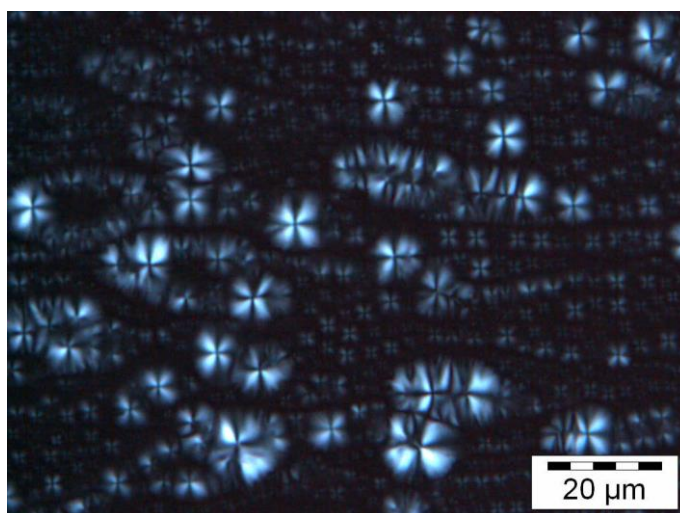


Figure 23. Image de microscopie en lumière polarisée d'une production de MLLs fabriqués à partir de 4% d' $\epsilon$ -viniférine

Le protocole de fabrication a donc été modifié par rapport au protocole précédemment publié [200]. Ainsi, l'hydratation en 2 ajouts et l'augmentation du pourcentage d' $\epsilon$ -viniférine (passant de 3% à 4%) ont nettement amélioré le taux d'encapsulation qui est alors passé de  $58 \pm 3\%$  à  $80 \pm 4\%$ . Selon l'étude de Crauste-Manciet *et al.* 2013 [228], l'incorporation de l'eau de manière fractionnée augmente la formation de liposomes multilamellaires par comparaison aux unilamellaires, ce qui justifie cette amélioration du taux d'encapsulation.

### 1.3 Séparation de l' $\epsilon$ -viniférine non-encapsulée par les méthodes conventionnelles

La mesure du taux d'encapsulation passe obligatoirement par une étape qui permet de séparer les MLLs de l' $\epsilon$ -viniférine non encapsulée. Les méthodes conventionnelles existantes pour cette séparation sont :

-**la séparation sur colonne** (Figure 24, A) qui repose sur le principe de la chromatographie par exclusion de taille ;

-**l'ultracentrifugation** (Figure 24, B) qui permet de faire précipiter les liposomes et garder en suspension les molécules non encapsulées.

Cependant, celles-ci présentent plusieurs inconvénients dont le principal est le temps de réalisation. Nous avons donc souhaité développer une nouvelle méthode plus rapide, celle-ci est basée sur la filtration inverse (Figure 24, C).

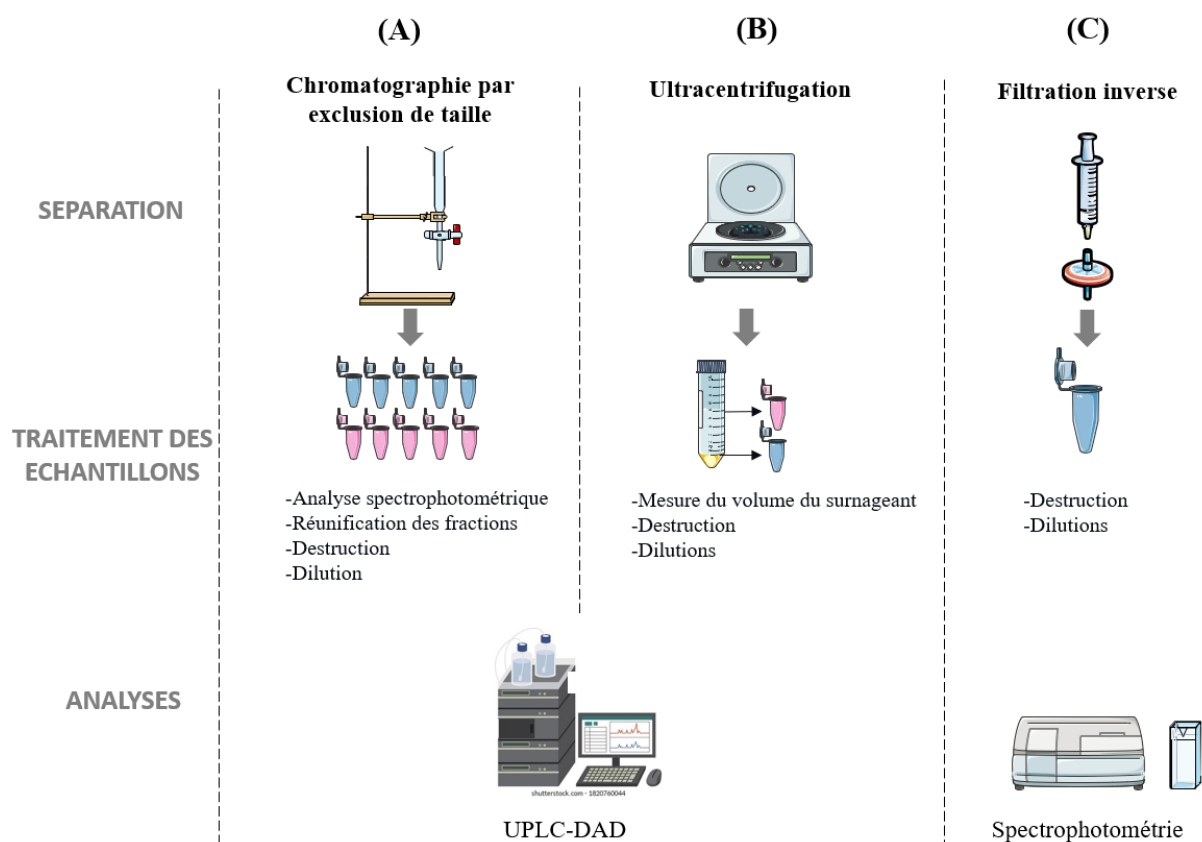


Figure 24. Différents protocoles de mesure du taux d'encapsulation d'une suspension de MLLs contenant l' $\epsilon$ -viniférine encapsulée et non-encapsulée. (A) Chromatographie d'exclusion de taille, (B) ultracentrifugation et (C) filtration inverse.

Pour le développement de la méthode de séparation par filtration inverses, plusieurs paramètres ont été déterminés :

- la nature des filtres utilisés pour filtrer la suspension de MLLs afin de retenir l' $\epsilon$ -viniférine non-encapsulée, et ne pas retenir les MLLs ;
- la capacité des filtres à retenir une quantité donnée d' $\epsilon$ -viniférine ;
- les spectres d'absorbances de composants des MLLs.

#### ***1.4 De développement de la méthode de séparation de l' $\epsilon$ -viniférine non-encapsulée***

Les résultats du développement de la méthode de séparation de l' $\epsilon$ -viniférine non-encapsulée ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans le journal *Pharmaceutics* :

Beaumont, P., Courtois, A., Richard, T., Krisa, S., & Faure, C. (2021). Encapsulation of  $\epsilon$ -viniferin into multi-lamellar liposomes: Development of a rapid, easy and cost-efficient separation method to determine the encapsulation efficiency. *Pharmaceutics*, 13(4), NA. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040566>

Article

# Encapsulation of $\epsilon$ -Viniferin into Multi-Lamellar Liposomes: Development of a Rapid, Easy and Cost-Efficient Separation Method to Determine the Encapsulation Efficiency

Pauline Beaumont<sup>1,2</sup>, Arnaud Courtois<sup>1,2,3</sup> , Tristan Richard<sup>1,2</sup> , Stéphanie Krisa<sup>1,2</sup>  and Chrystel Faure<sup>4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> UR Œnologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon, France; pauline.beaumont@u-bordeaux.fr (P.B.); arnaud.courtois@u-bordeaux.fr (A.C.); tristan.richard@u-bordeaux.fr (T.R.); stephanie.krisa@u-bordeaux.fr (S.K.)

<sup>2</sup> Bordeaux INP, UR Œnologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>3</sup> Centre Antipoison et de Toxicovigilance de Nouvelle Aquitaine, Bâtiment UNDR, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

<sup>4</sup> Department of Chemistry, Université de Bordeaux, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

<sup>5</sup> Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

\* Correspondence: chrystel.faure@enscbp.fr; Tel.: +33-540-006-833; Fax: +33-540-008-496



**Citation:** Beaumont, P.; Courtois, A.; Richard, T.; Krisa, S.; Faure, C. Encapsulation of  $\epsilon$ -Viniferin into Multi-Lamellar Liposomes: Development of a Rapid, Easy and Cost-Efficient Separation Method to Determine the Encapsulation Efficiency. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 566. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040566>

Academic Editors: Antonio María Rabasco Álvarez and María Luisa González Rodríguez

Received: 28 January 2021

Accepted: 8 April 2021

Published: 16 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Onion-type multi-lamellar liposomes (MLLs), composed of a mixture of phosphatidylcholine and Tween 80, were analyzed for their ability to encapsulate  $\epsilon$ -Viniferin ( $\epsilon$ Vin), a resveratrol dimer. Their encapsulation efficiency (EE) was measured by UV-VIS spectroscopy using three different separation methods—ultracentrifugation, size exclusion chromatography, and a more original and advantageous one, based on adsorption filtration. The adsorption filtration method consists indeed of using syringe filters to retain the molecule of interest, and not the liposomes as usually performed. The process is rapid (less than 10 min), easy to handle, and inexpensive in terms of sample amount (around 2 mg of liposomes) and equipment (one syringe filter is required). Whatever the separation method, a similar EE value was determined, validating the proposed method. A total of  $80\% \pm 4\%$  of  $\epsilon$ Vin was found to be encapsulated leading to a 6.1% payload, roughly twice those reported for resveratrol-loaded liposomes. Finally, the release kinetics of  $\epsilon$ Vin from MLLs was followed for a 77 day period, demonstrating a slow release of the polyphenol.

**Keywords:** encapsulation efficiency;  $\epsilon$ -Viniferin; multi-lamellar liposomes; adsorption filtration; polyphenol

## 1. Introduction

Encapsulation involves the incorporation of molecules, macromolecules, particles or microorganisms in small capsules. This technology offers a broad scope of applications in business sectors as varied as pharmaceuticals, cosmetics, agrochemicals and food industries. Probiotics, antioxidants, minerals, flavoring agents, sweeteners, and nutrients are among the ingredients that have already been encapsulated for food applications [1,2]. In this case, encapsulation has been developed to protect the ingredient from moisture, heat, or other extreme conditions, as well as to impede its interactions with the food matrix and to improve the food organoleptic properties (odor, taste, etc.). Encapsulation is also highly beneficial for drug delivery to improve the efficiency of medical treatments [3–5]. Microparticles could offer the possibility to accurately control the release rate of the incorporated drug over periods of hours to months and to target a specific site [3,6,7].

For pharmaceutical drugs, and for functional food ingredients having potential health benefits, encapsulation in liposomes is regarded as a solution to enhance their bioavailability (for oral delivery) and biostability [8–10]. In one of our recent papers, onion-type multilamellar liposomes were demonstrated to highly increase the solubility of  $\epsilon$ -Viniferin ( $\epsilon$ Vin), a resveratrol dimer, and to decrease its cell toxicity and light sensitivity [11]. This

natural polyphenol is found in various edible plants [12], and therefore in human food, especially in grape-derived products [13]. It exhibits antioxidant [14], anti-inflammatory [15], anti-proliferative [16], neuroprotective [17,18], and anti-adipogenic [19] properties, generating a growing interest for pharmaceutical and food industries. However, the few pharmacokinetic studies about  $\epsilon$ Vin have demonstrated a very low bioavailability, mainly due to its poor absorption and high metabolism [20,21].

Similar to most of the bioactive molecules used in pharmaceutical industry, this natural compound is valuable, notably because of the several purification steps conducted after extraction. Consequently, when encapsulating such expensive or seldom molecules, the encapsulation efficiency (EE) has to be as high as possible. EE is defined as the percentage, or fraction, of the bioactive molecule added in the process of manufacture that is associated with the carrier. It quantifies the molecule loading. The release kinetics from liposomes is also an important feature as it defines the amount of free molecule available over time to provide the therapeutic effect [22]. The measurement of EE as well as the determination of molecule release profiles require methods to separate the carriers from their dispersion medium. Separation is typically achieved by filtration [23,24], ultra-centrifugation, or centrifugal ultrafiltration [25]. Other possible routes for removal of non-encapsulated material include dialysis-based methods [26], gel-permeation chromatography, ion-exchange chromatography, and size exclusion chromatography [11]. All these techniques present advantages but also drawbacks. Filtration-based methods in which carriers are retained by the filter are not suitable for tiny or/and deformable carriers such as liposomes [27]. Centrifugation methods may lead to carrier leakage [28]. Chromatography processes diminish product yield by column equilibration which dilutes the final product [29], and are time-consuming, similar to dialysis-based ones. Rapidity is yet an important criterion; it is a prerequisite in industry for screening but also to establish the real-time determination of the amount of free drug in the course of its release.

We developed a new separation method to determine carriers' EE, based on adsorption filtration, and aimed to simplify and speed up the quantification. The proposed method is inspired by the adsorption by membrane filtration technology currently used in water treatment [30]. It was applied to  $\epsilon$ Vin-loaded multi-lamellar liposomes (MLLs) and compared to classical separation methods (size exclusion chromatography, ultracentrifugation) in terms of EE value and advantages/drawbacks. Finally, by applying the adsorption filtration method to  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs, the time-dependent release of the polyphenol was established.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Materials

Methanol, ethanol, acetonitrile, Tween 80, ammonium molybdate tetrahydrate, L-ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Syringe filters with 25 mm diameter and 0.45  $\mu$ m pore size, unless specified, were used for filtration. Whatman<sup>®</sup> cellulose acetate and Anapore (alumina-based membrane) filters came from Sigma Aldrich, Clearline<sup>®</sup>, polyvinylidene fluoride (PVDF) from Dominique Dutscher (Brumath, France), polytetrafluoroethylene (PTFE) from Carl Roth, and Nylon and polyethylene sulfone (PES) from Fischer Scientific. Lipoid P75 (soybean lecithins with 68–74% phosphatidylcholine and 7–11% phosphatidylethanolamine) was purchased from Lipoid GmbH (Germany). Potassium phosphate monobasic was from Riedel-de Haën while perchloric acid was from Merck Millipore.  $\epsilon$ Vin was extracted and purified from grape shoot as previously described [31]. Purity (>89%) and structure were confirmed by proton NMR and high-resolution mass spectrometry.

### 2.2. Preparation of Onion-Type MLLs

$\epsilon$ Vin-loaded onions and plain onions (without  $\epsilon$ Vin) were prepared as previously described [11] with some modifications to improve their encapsulation efficiency based on the work of Crauste-Manciet et al. [32]. Briefly, about 200 mg of  $\epsilon$ Vin (4 wt%), Tween



80 (11.5 wt%) and lipoid P75 (52.5 wt%), the onions components, were first individually solubilized in ethanol before gathering the fractions. Ethanol was then removed by evaporation under N<sub>2</sub> flux (0.1 bar). Two milliliters of Milli-Q water were added to the evaporated mixture and stored at −80 °C for 24 h. Freeze-drying was then conducted (48 h). The obtained powder was then accurately weighed in a 1 mL vial (68 wt% of the total onion mass) and Milli-Q water (16 wt% of the total onion mass) was added. Shearing of the hydrated mixture was conducted (1 min) using a spatula before adding the other half-part of water (16 wt%). Then, three consecutive cycles of shearing–centrifugation were conducted. Shearing was applied for 5 min as was centrifugation (2000 rpm). Three other cycles of shearing–centrifugation were conducted after storing the preparation for 24 h at 4 °C. The obtained viscous paste is composed of onion-type MLLs in close contact [33]. MLLs can be dispersed in Milli-Q water by gentle agitation using a vortex stirrer (500 rpm). The liposomes' multi-lamellarity was checked by polarized light microscopy (Olympus, BX51) with x60 and x100 magnifications.

### 2.3. Determination of MLLs Size

MLL average diameter was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Vasco particle size analyzer (Cordouan Technologies Ltd., Pessac, France). Three acquisitions of 180 s were recorded on a 1 mg mL<sup>−1</sup> MLL dispersion using a refractive index of 1.45 and 1.33 for the liposomes and the external aqueous phase, respectively. The average diameter was determined using the cumulant method (intensity). MLL diameter was also measured by static light diffusion using a MasterSizer 2000 apparatus (Malvern) on a 30 mg mL<sup>−1</sup> MLL dispersion. The same refractive indexes were used for the Mie theory.

### 2.4. Determination of MLLs Charge

The zeta potentials of plain MLLs and εVin-loaded MLLs were measured with a ZetaSizer Nano Series (Malvern) using DTS1070 cells. The dispersion was concentrated at 1 mg mL<sup>−1</sup> in Milli-Q water. Three measurements of 100 runs were performed.

### 2.5. Phosphorus Assay

To determine the percentage of MLLs retained by a 5 μm-pore sized PVDF filter, a phosphorus assay based on the Rouser protocol was carried out since MLLs were composed of phospholipids [34].

First, a calibration curve was established on KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aqueous solutions with concentrations ranging from 4.4 to 22 μg mL<sup>−1</sup>, which corresponded to phosphorus concentrations ranging from 1 to 5 μg mL<sup>−1</sup>. A linear variation (R<sup>2</sup> = 0.9978) was found. To be in the linear range of the calibration curve, a 250 μg mL<sup>−1</sup> dispersion of εVin-loaded MLLs was chosen. One milliliter of this dispersion was passed through a 5 μm-pore sized PVDF filter, the filtrate was poured in silicated glass tubes for freeze-drying (48 h). After water removal, 650 μL of 70% perchloric acid was added and the tubes, on which a marble ball was deposited to prevent perchloric acid evaporation, were heated to 180 °C in a block oven for 30 min. After cooling down in ambient air (approximately 5 min), 500 μL of 25 mg mL<sup>−1</sup> ammonium molybdate solution and 500 μL of 100 mg mL<sup>−1</sup> freshly-prepared ascorbic acid solution was added. The tubes were then plunged into boiling water for 10 min before reading the absorbance at 800 nm using Milli-Q water as the reference. A negative control was performed on freeze-dried Milli-Q water. The retention percentage of liposomes, %R<sub>lip</sub>, was deduced from the absorbances measured at 800 nm before and after filtration. The error on %R<sub>lip</sub> value was deduced from 4 different assays.

### 2.6. UHPLC Analysis

The UHPLC apparatus was an Agilent 1290 Series equipped with an auto sampler module, a binary pump with a degasser, a heater/selector column and a UV-VIS diode array detector (DAD). The column used for εVin analysis was a Zorbax SB-C18 100 mm × 2.1 mm i.d., 1.8 μm column equipped with a 2.1 mm × 5 mm i.d. guard col-

umn (Agilent). Solvent A was water and solvent B acetonitrile, both acidified with 0.1% formic acid. The gradient used was as follows: 0–1.7 min, 10% B; 1.7–3.4 min, 10–20% B; 3.4–5.1 min, 20–30% B; 5.1–7.8 min, 30% B; 7.8–8.5 min, 30–35% B; 8.5–11.9 min, 35–60% B; 11.9–15.3 min, 60–100% B; 15.3–17 min, 100% B; 17–17.3 min, 100–10% B, and the injection volume was 2  $\mu\text{L}$ . The quantification was performed with an area under curve of  $\epsilon\text{Vin}$  at 320 nm (Bruker Data Analysis 3.2) using a  $\epsilon\text{Vin}$  standard curve from 0 to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in water:methanol (1:1) ( $R^2 = 0.9992$ ).

### 2.7. Spectrophotometric Analysis

The spectrophotometer was an UH5300 Hitachi. The 1 cm-pathlength cells in quartz were used filled with 600  $\mu\text{L}$  of solution. The spectra and absorbances were registered using either water or water:methanol (1:1) solutions for reference. Quantification of  $\epsilon\text{Vin}$  was performed at 325 nm using a standard curve from 2.5 to 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9982$ , Supplementary Materials Figure S1).

### 2.8. Size Exclusion Chromatography (SEC)

Separation of free  $\epsilon\text{Vin}$  from encapsulated  $\epsilon\text{Vin}$  was performed as previously described [11]. An 8  $\times$  0.8 cm column filled with Sephacryl S-300 high resolution gel was used. The column was saturated with 400  $\mu\text{L}$  of a 25  $\text{mg mL}^{-1}$  dispersion of plain MLLs. Afterwards, 400  $\mu\text{L}$  of a 25  $\text{mg mL}^{-1}$   $\epsilon\text{Vin}$ -loaded MLL was deposited on the gel surface and eluted with water. Fractions (1 mL) were collected and their absorbance was measured at 436 nm to select the MLL-containing fractions. These fractions (1 to 5) were gathered, and MLLs were destructed by adding an equal volume of methanol. The released  $\epsilon\text{Vin}$  was quantified by UHPLC analysis. From fraction 9 to 25, methanol was used instead of water for elution. Fractions 16 to 20 containing  $\epsilon\text{Vin}$  were checked by the UV signal given at 325 nm. These fractions were gathered before UHPLC analysis to quantify the non-encapsulated  $\epsilon\text{Vin}$ .

### 2.9. Ultracentrifugation

A 10  $\text{mg mL}^{-1}$  of  $\epsilon\text{Vin}$ -loaded onion dispersion was prepared. The total concentration of  $\epsilon\text{Vin}$  in this dispersion was checked by UHPLC after MLL destruction by methanol addition. Five hundred microliters of the 10  $\text{mg mL}^{-1}$  dispersion was centrifuged (Beckmann Coulter, France) for 1 h, at 100,000  $\times g$ , 4  $^\circ\text{C}$  with a strong acceleration and gentle deceleration. Both supernatant (containing the free  $\epsilon\text{Vin}$ ) and pellet (containing the encapsulated  $\epsilon\text{Vin}$ ) were analyzed by UHPLC after correct dilution to be in the calibration curve. The pellet was treated with methanol before analysis to disrupt  $\epsilon\text{Vin}$ -loaded MLLs.

### 2.10. Retention Percentage of $\epsilon\text{Vin}$ by Filters

To determine the affinity of  $\epsilon\text{Vin}$  for different filter membranes, a solution of  $\epsilon\text{Vin}$  (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in water containing 4% methanol) was passed through filters, and the absorbance at 325 nm was measured before and after filtration. The percentage of  $\epsilon\text{Vin}$  retention,  $\%R_{\text{vin}}$  was calculated using the following equation:

$$\%R_{\text{vin}} = 100 \times (1 - \text{Abs}_f / \text{Abs}_i)$$

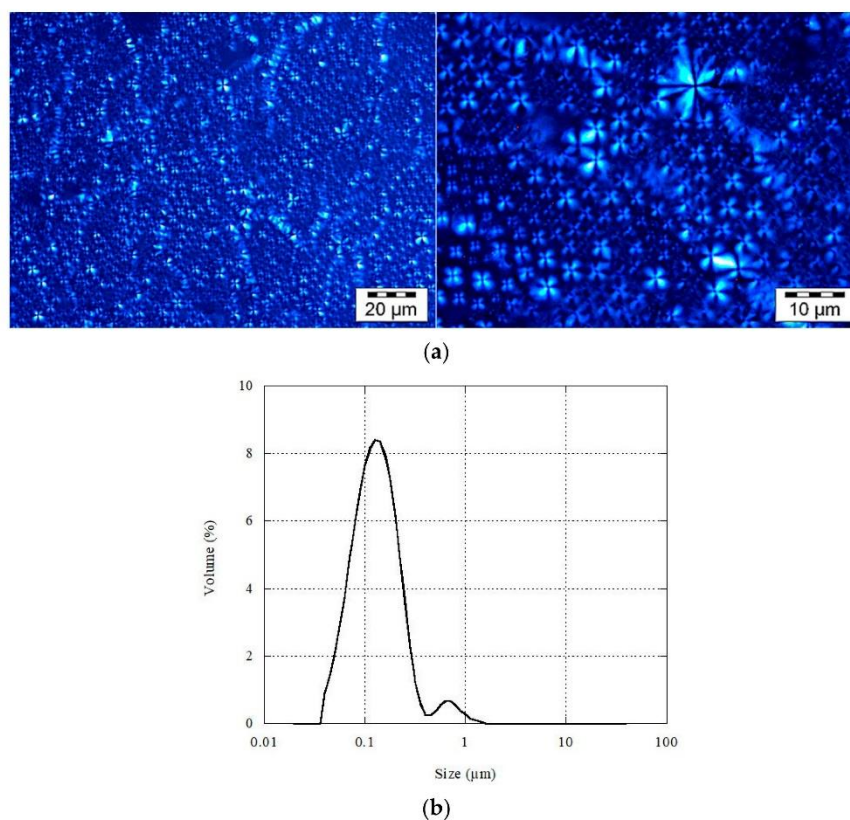
where  $\text{Abs}_f$  and  $\text{Abs}_i$  are the absorbances measured at 325 nm on the filtrate and on the  $\epsilon\text{Vin}$  initial solution, respectively. The error on  $\%R_{\text{vin}}$  value was deduced from 4 measurements.

## 3. Results

### 3.1. Multilamellar Liposomes Characterization

The multi-lamellar character of the  $\epsilon\text{Vin}$ -loaded liposomes was checked by optical microscopy under polarized light. As expected, multi-lamellar vesicles were obtained since Maltese crosses, the pattern typical of birefringent MLLs, were observed (Figure 1a). The process we used, i.e., the shearing of a lamellar phase composed of phospholipids and

hydrated to its maximal swelling, is indeed well-known to result in the production of MLLs called onions or spherulites [11,32,35,36].



**Figure 1.** (a) Images of multi-lamellar liposomes (MLLs) after shearing observed under polarized light, and (b) their size distribution when dispersed in water.

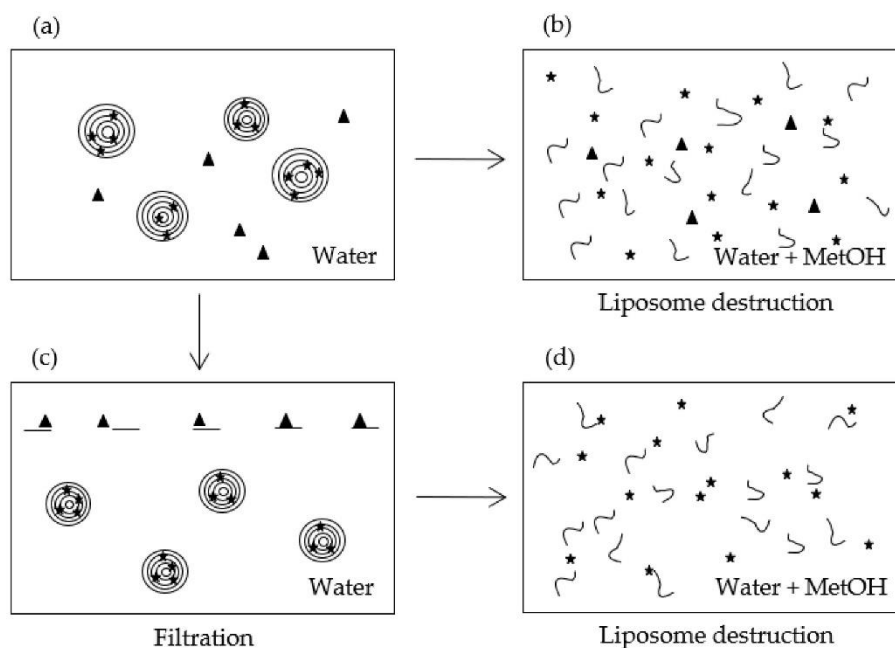
Static light diffusion was conducted on an aqueous dispersion of onions containing 4 wt%  $\epsilon$ Vin. Figure 1b shows their size distribution. A volume representation is given to give evidence for the presence of the largest MLLs (span factor 2.3). Indeed, the  $R^3$ -dependence of the liposome volume,  $R$  being the MLLs radius, ensures that large MLLs strongly contribute to the volume so that this type of representation is adapted when their number is low (see Supplementary Materials Figure S2 for number representation). As seen in Figure 1b, MLLs were smaller than 2  $\mu\text{m}$ . Their size was also evaluated by DLS. Their average diameter was  $261 \pm 5$  nm. Their zeta potential was found to be  $-44 \pm 5$  mV. The same analyses were conducted on MLLs devoid of  $\epsilon$ Vin—their size was found to be  $222 \pm 3$  nm and their zeta potential  $-25 \pm 5$  mV. The change in the zeta potential can be attributed to  $\epsilon$ Vin. Its value measured on  $\epsilon$ Vin-loaded onions was in agreement with previous measurements on onions containing 3 wt%  $\epsilon$ Vin [11]. It was similar to the one reported for phosphatidylcholine-based MLLs containing its monomer, resveratrol [37]. Such an increase in the zeta potential was attributed, in the case of resveratrol, to the aromatic rings of the polyphenol embedded in the membranes [38].

### 3.2. The Adsorption Filtration Method

#### 3.2.1. Description of the Method

The method requires working with porous membranes so that (i) their pore size is larger than the liposomes' diameter, and (ii) their composition ensures a high retention of the molecule of interest and a low retention of the liposomes. Hence, in this method, filters are used to retain the material and not the carriers, which is the opposite way of the classical

filtering methods. As schemed in Figure 2, part of the liposome dispersion (Figure 2a) is treated in order to break the MLLs and release the encapsulated molecule (Figure 2b) while the other part is filtered (Figure 2c). The filtrate is then also treated to destroy liposomes (Figure 2d). Liposome destruction can be induced by adding either a solvent such as ethanol or methanol, or a surfactant like Triton. In the case of MLLs, Gonzalez Gomez et al. demonstrated that methanol was much more efficient than Triton [26]. This solvent was then used in this study.



**Figure 2.** Scheme illustrating the different schemes of the method. (a) Dispersion of  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs in water, (b) destruction of  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs, (c) filtration of the  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs dispersion, (d) destruction of the filtrated the  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs dispersion. The stars correspond to encapsulated molecules, the triangles to free molecules.

### 3.2.2. Establishment of EE Equation using UV-VIS Spectrophotometry

UV-VIS spectrophotometry is a rapid and quite cheap technique to assay molecules absorbing in the 200–800 nm range. Polyphenols, such as  $\epsilon$ Vin, belong to this category. When liposomes have a size comparable to the wavelengths of light used in optical spectroscopy, the absorbance signal of the molecule, occurring at  $\lambda_{\max}$ , is conflated with scattering induced by liposomes. This results in a baseline sloping upwards as the wavelength is lowered [11,39]. This scattering reflects indirectly the size and the volume concentration of the liposomes. Matsuzaki et al. showed that the absorbance measured at 436 nm (turbidity),  $A_{436}$ , is affected by these two factors [40]. The integrity of MLLs can then be followed by the measurement of  $A_{436}$ . Once broken by organic solvent addition, light scattering should vanish and the turbidity tends to zero.  $A_{436}$  was then registered in the initial dispersion (Figure 2a) to check MLL integrity and after methanol addition (Figure 2b,d) to validate their bursting.

Once liposomes are disrupted, the bioactive molecule is co-solubilized with liposome components. These components could absorb at  $\lambda_{\max}$ . Their contribution in the whole dispersion after methanol solubilization (Figure 2b) at  $\lambda_{\max}$ , is given by  $A_{\text{comp}}$ :

$$A_{\text{comp}} = A_2^{\max} - A_{\text{tot}}^{\max} \quad (1)$$

$A_2^{\max}$  corresponds to the absorbance measured at  $\lambda_{\max}$  on the broken liposomes (Figure 2b), i.e., the signal given by free and released bioactive molecules in the pres-

ence of the solubilized liposomes components.  $A_{\text{tot}}^{\text{max}}$  is the absorbance given by a solution of bioactive molecules at a concentration equivalent to the one in the liposomes dispersion.  $A_{\text{tot}}^{\text{max}}$  is known and is deduced from the standard curve.

Assuming that no liposomes are retained by the filter, the concentration of bioactive compounds in the initial dispersion  $[\text{Act}]_{\text{enc}}$  is given by:

$$[\text{Act}]_{\text{enc}} = [\text{Act}]_{\text{enc}}^{\text{f}} = \frac{A_4^{\text{max}} - A_{\text{comp}}}{\epsilon l} \quad (2)$$

where  $[\text{Act}]_{\text{enc}}^{\text{f}}$  is the concentration of the encapsulated bioactive compound in the filtrate,  $A_4^{\text{max}}$  is the absorbance measured at  $\lambda_{\text{max}}$  on the solubilized liposomes after filtration (Figure 2d),  $l$  is the cell thickness and  $\epsilon$  is the extinction coefficient of the active compound. Let us note that  $\epsilon$  was not affected by the solubilized liposomes components in our study.

The encapsulation efficiency, EE, is the percentage of encapsulated active compound relative to the total active used in the dispersion. It is then calculated via the following equation:

$$\text{EE} = 100 \times \frac{[\text{Act}]_{\text{enc}}}{[\text{Act}]_{\text{tot}}} = 100 \times \left( \frac{A_4^{\text{max}} - A_{\text{comp}}}{A_{\text{tot}}^{\text{max}}} \right) = 100 \times \left( 1 - \frac{A_2^{\text{max}} - A_4^{\text{max}}}{A_{\text{tot}}^{\text{max}}} \right) \quad (3)$$

EE requires then to measure the absorbances at  $\lambda_{\text{max}}$  in the MetOH-treated dispersions (Figure 2b,d) and to establish the calibration curve of the bioactive molecule at  $\lambda_{\text{max}}$ .

In the case where part of the bioactive molecule is retained by filtration, EE must be corrected using Equation (4):

$$\text{EE}_c = 100 \times \left( 1 - \frac{A_2^{\text{max}} - A_4^{\text{max}}}{\%R \times A_{\text{tot}}^{\text{max}}} \right) \quad (4)$$

where %R is the percentage of retention of the bioactive molecule.

In the case where part of the liposomes is retained by the filter, EE is given by the following expression (Supplementary Materials Equations (S1)–(S8)):

$$\text{EE} = 100 \times \left( \frac{A_4^{\text{max}} - A_{\text{comp}}^{\text{f}}}{A_{\text{tot}}^{\text{max}}} \right) \times \frac{100}{(100 - \%R_{\text{lip}})} \quad (5)$$

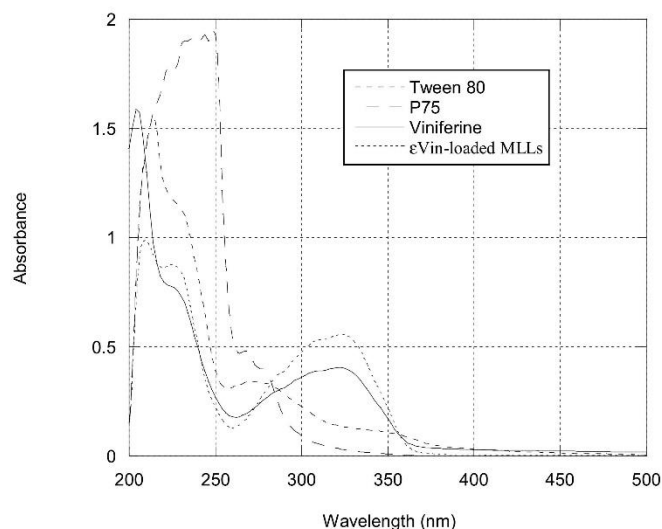
where  $\%R_{\text{lip}}$  is the percentage of liposomes retained by the filter, and  $A_{\text{comp}}^{\text{f}}$  is the contribution at  $\lambda_{\text{max}}$  of liposome components after filtration, i.e., in the filtrate.

### 3.3. Determination of $\epsilon$ Vin EE by Adsorption Filtration

#### 3.3.1. Spectral Analysis of MLLs Components, and $\epsilon$ Vin

Figure 3 collects UV-vis spectra of the different MLL components. As reported in literature,  $\epsilon$  Vin in methanol presents a maximum of absorption at 325 nm [11]. The calibration curve of  $\epsilon$  Vin (Supplementary Materials Figure S1) was established in a mixture of MetOH:water (1:1 v:v), the solvent in which  $\epsilon$  Vin was co-solubilized with MLL components (Figure 2b,d). After destruction of  $\epsilon$  Vin-loaded MLLs, a peak at 325 nm was observed in the spectrum but its intensity (0.4) is higher than the expected value (0.29) considering  $\epsilon$  Vin concentration ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the calibration curve equation. This is due to the contributions of MLL components after MLL destruction as seen in Figure 3—P75 the main component of MLLs also absorbed at 325 nm when solubilized in MetOH:water, as Tween 80 but to a much lesser extent.

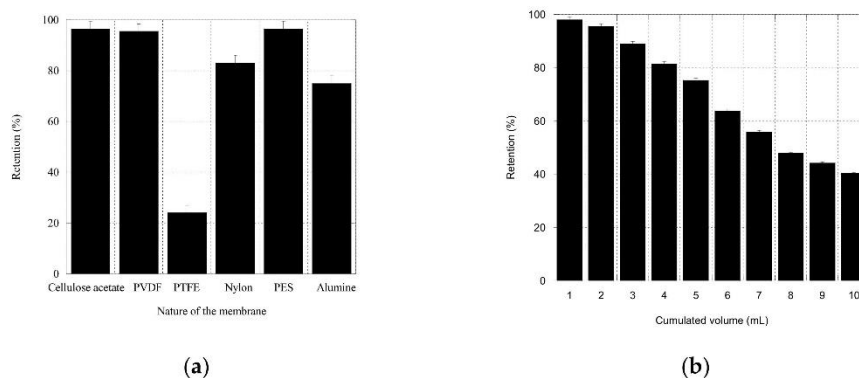
The spectrophotometric behavior of solubilized MLL components (Equation (1)) was then taken into account for the calculation of EE (Equation (3)).



**Figure 3.** UV-vis spectrum of  $\epsilon$  Vin ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  in MetOH),  $\epsilon$  Vin-loaded MLLs after destruction in MetOH:water (1:1) with  $\epsilon$  Vin concentration of  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , P75 in MetOH:water (1:1) ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), and Tween 80 in MetOH:water (1:1) ( $8 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

### 3.3.2. Choice of the Nature of the Syringe Filter Membrane

The ability of different filters to retain  $\epsilon$  Vin (Figure 4a) was compared by measuring the percentage of retention of  $\epsilon$  Vin,  $\%R_{\text{vin}}$  (Section 2.10).



**Figure 4.** Percentage of retention for a solution of  $\epsilon$  Vin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) passing through syringe filters. (a) Filters differing in the nature of the membrane (filter pore  $0.45 \mu\text{m}$ ). (b) Polyvinylidene fluoride (PVDF) filter ( $5 \mu\text{m}$  pore-sized). Error bars were calculated by measurements on 4 different filters.

Among the filters tested (Acetate cellulose, Nylon<sup>®</sup>, PES, PVDF, PTFE), PVDF filters were chosen because their retention efficiency was elevated ( $97 \pm 4\%$ ), and because large pore-sized PVDF filters were commercially available. The  $5 \mu\text{m}$  pore-sized PVDF filters were then tested for their limit of saturation. A solution of  $\epsilon$  Vin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was filtered through one single filter, and 10 individual fractions ( $1 \text{ mL}$ ) were collected in which  $\epsilon$  Vin concentration was quantified by spectrophotometry. Figure 4b shows that  $\%R_{\text{vin}}$  depended on the filtrated volume. It decreased from  $98 \pm 3\%$  to  $96 \pm 3\%$  for 1 to 2 mL and pursued its decrease for larger volumes. Since no more than 2 mL of  $\epsilon$  Vin-loaded MLLs was needed in the adsorption filtration protocol,  $\%R_{\text{vin}}$  was fixed to  $97 \pm 4\%$ .

### 3.3.3. Liposomes Retention by 5 $\mu\text{m}$ Pore-Sized PVDF Filters

Given the onion size distribution (Figure 1b), 5  $\mu\text{m}$  pore-sized filters were chosen. To measure the retention percentage of MLLs,  $\%R_{\text{lip}}$ , a phosphorus assay based on the Rouser protocol was conducted before and after filtration on 5  $\mu\text{m}$ -sized PVDF filter. Several rates and MLL concentrations (Supplementary Materials Table S1) were tested to filtrate  $\epsilon\text{Vin}$ -loaded MLL dispersions. Whatever the applied rate and the concentration, all the MLLs passed through the filter so that  $\%R_{\text{lip}}$  was 0%. This confirmed that, on one hand, onions were smaller than 5  $\mu\text{m}$ , and, on the other hand, the liposomes had no affinity for the hydrophobic PVDF membrane.

### 3.3.4. Calculation of the Encapsulation Efficiency

Table 1 gathers the absorbances of the four samples (corresponding to each part of Figure 2) measured at 436 nm (signature of the liposomes, Section 3.2.2) and 325 nm (signature of  $\epsilon\text{Vin}$ , Section 3.3.1). From the values measured at 436 nm after methanol treatment, one can conclude that MLLs were indeed disrupted since their values were very low ( $<0.025$ ).

**Table 1.** Values of absorbance measured at 436 nm (MLLs) and 325 nm ( $\epsilon\text{Vin}$ ) for a 1 mg mL<sup>-1</sup> dispersion of  $\epsilon\text{Vin}$ -loaded MLLs containing 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $\epsilon\text{Vin}$ . Filtration was realized with 5  $\mu\text{m}$  pore-sized PVDF filters. MLLs were disrupted by addition of an equal volume of methanol. The standard deviation is  $\pm 0.006$ .

Figure 2	Dilution	$A_i^{436}$	$A_i^{325}$
(a) $\epsilon\text{Vin}$ -MLLs whole aqueous dispersion	1	0.221	
(b) $\epsilon\text{Vin}$ -MLLs whole aqueous dispersion plus methanol (1:1)	4	0.023	0.693
(c) Filtered $\epsilon\text{Vin}$ -MLLs aqueous dispersion	1		1.694
(d) Filtered $\epsilon\text{Vin}$ -MLLs aqueous dispersion plus methanol (1:1)	4	0.016	0.578

The expected value of  $\epsilon\text{Vin}$  absorbance,  $A_{\text{tot}}^{\text{max}}$  is given by the calibration curve established at  $\lambda_{\text{max}} = 325$  nm (Supplementary Materials Figure S1). The encapsulation efficiency of  $\epsilon\text{Vin}$  in onion-type MLLs was calculated to be  $80 \pm 4\%$  using Equation (3) (Table 2). After correction by the  $\epsilon\text{Vin}$  filter retention percentage ( $\%R_{\epsilon\text{Vin}} 97 \pm 4\%$ ) a final value of  $79 \pm 4\%$  was found.

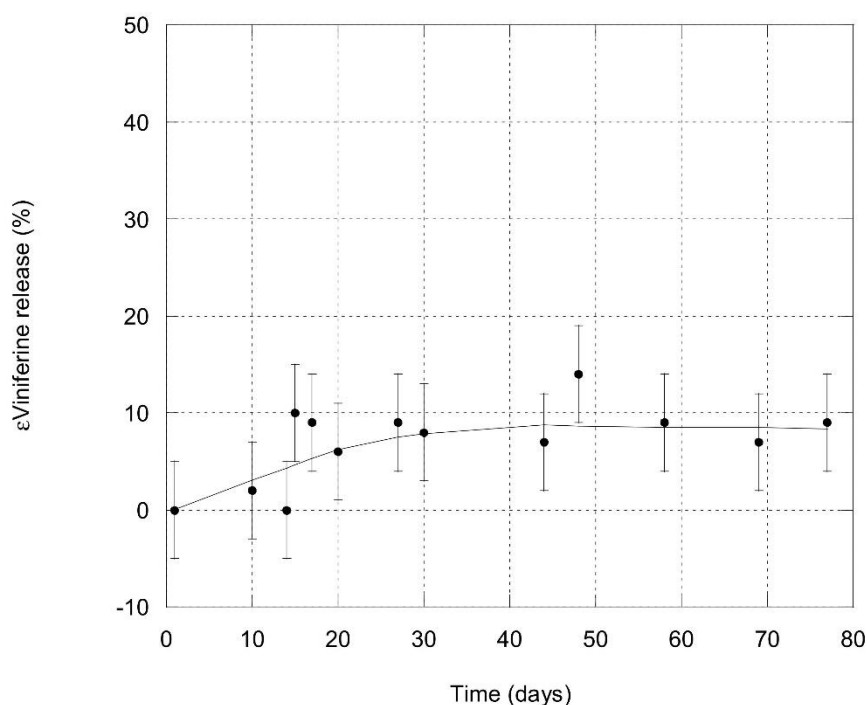
**Table 2.** Data values to calculate the encapsulation efficiency of  $\epsilon\text{Vin}$  in MLLs.

	Value	Notation	Calculation
Percentage of retention of MLLs	0%	$\%R_{\text{lip}}$	Phosphorus assay
Theoretical A for $\epsilon\text{Vin}$	0.577	$A_{\text{tot}}^{325}$	Calibration curve
Contribution of lipids and surfactant to the signal given at 325 nm in the whole dispersion	$0.116 \pm 0.006$	$A_{\text{comp.}}$	Equation (1)
Contribution of $\epsilon\text{Vin}$ to the signal given at 325 nm by the filtrate	$0.462 \pm 0.006$	$[\text{Act}]_{\text{enc}\epsilon\text{l}}^{\text{f}}$	Equation (2)
Encapsulation efficiency	$80 \pm 4\%$	EE	Equation (3)
Encapsulation efficiency corrected by $\%R_{\text{Vin}}$	$79 \pm 4\%$	$\text{EE}_c$	Equation (4)

### 3.4. Stability of $\epsilon\text{Vin}$ -Loaded MLLs

The release of  $\epsilon\text{Vin}$  from MLLs was studied for 77 days by repeated quantification of EE using the adsorption filtration separation method. A total of 4 wt% of stilbene was introduced in the composition of MLLs. Before each measurement, the entire dispersion (50 mL at 1 mg mL<sup>-1</sup>) was centrifuged at 500 rpm for 10 min in order to induce precipitation of any  $\epsilon\text{Vin}$  that would have leaked from MLLs and formed aggregates (see Section 4.2). This low rate ensured that MLLs did not precipitate. Analyses were then conducted on the supernatant. To quantify EE,  $A_{\text{comp.}}$  was fixed to its initial value of 0.12 (measured

on day 1) to remove any bias arising from the removal of part of the free  $\epsilon$ Vin which could have precipitated. Moreover, the value at 436 nm measured on the initial dispersion,  $A_1^{436}$  (Table 1) was systematically controlled. This value should be constant as long as the liposome structure is maintained (Section 3.2.2). Its value was 0.22 at day 1 and any value differing from  $0.22 \pm 0.02$  was not considered. Microscopic observations were also conducted every week to check that MLL structure was intact; this was the case even after 77 days. The time dependency of EE is reported in Figure 5 and shows that  $\epsilon$ Vin release from MLLs was very slow. After 77 days, 69% of  $\epsilon$ Vin was still encapsulated. As  $\epsilon$ Vin was embedded into the bilayers of MLLs, its release was slow.



**Figure 5.** Kinetics of  $\epsilon$ Vin release from onion-type MLLs. The error bar is deduced from three different measurements.

### 3.5. Determination of $\epsilon$ Vin EE by Classical Techniques

In that section, two classical techniques to separate free and encapsulated  $\epsilon$ Vin were used in order to calculate EE—ultra-centrifugation and size exclusion chromatography (SEC).

EE can be expressed by the following equation:

$$EE = 100 \times \frac{m_{\text{enc}}}{m_{\text{tot}}} = 100 \times \frac{(m_{\text{tot}} - m_{\text{f}})}{m_{\text{tot}}}$$

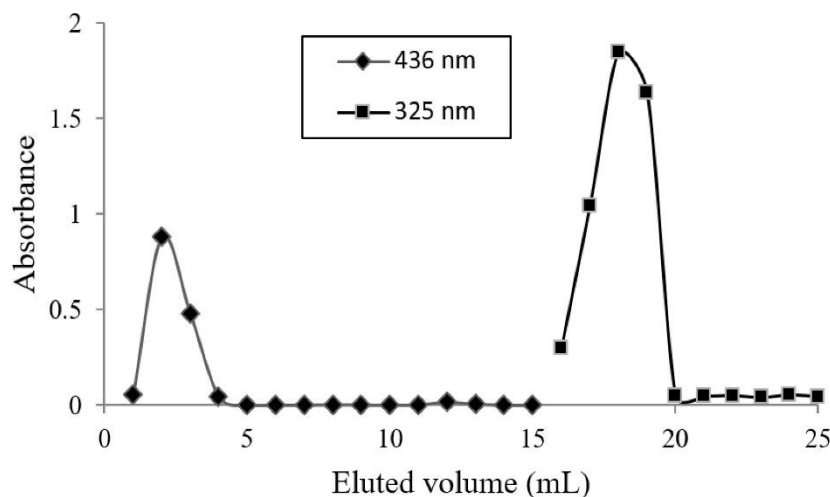
where  $m_{\text{tot}}$  is the total mass of  $\epsilon$ Vin in the MLLs dispersion,  $m_{\text{enc}}$  is the mass of encapsulated  $\epsilon$ Vin, and  $m_{\text{f}}$  is the mass of free  $\epsilon$ Vin, i.e., the mass of non-encapsulated  $\epsilon$ Vin.

When MLLs were separated by ultracentrifugation, EE was determined in two ways—by the measurement of  $m_{\text{f}}$  (from the supernatant) and  $m_{\text{i}}$  (from the sediment). Both values were identical— $82 \pm 1\%$ .

The experimental conditions to separate  $\epsilon$ Vin from MLLs by SEC were exposed in a previous study [11]; given  $\epsilon$ Vin has a strong affinity for the two usual SEC gels, Sephadex and Sephacryl, methanol was necessary to elute free  $\epsilon$ Vin. The polyphenol recovery was 98% with this organic solvent.  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs were then eluted with water, before collecting  $\epsilon$ Vin with methanol. The absorbance of each 1 mL fraction was measured at 436 and 325 nm and the results are given in Figure 6. MLLs, detected by their 436 nm signal,



sorted out of the column from fraction one to four while  $\epsilon$ Vin from fraction 16 to 19. EE was calculated from fractions one to five, i.e., measuring the concentration of encapsulated  $\epsilon$ Vin, by UHPLC. Using the calibration curve, an EE of  $78 \pm 1\%$  was deduced.



**Figure 6.** Elution profile of  $\epsilon$ Vin-loaded MLL aqueous suspension. Volume of each fraction—1 mL. Fractions 1 to 8 were eluted with water, and the others with methanol.

#### 4. Discussion

##### 4.1. $\epsilon$ Vin Encapsulation Efficiency and Payload

Compared to our previous study [11], EE was drastically improved—from  $58 \pm 3\%$  to  $80 \pm 4\%$ . The same composition was tested but with a higher amount of  $\epsilon$ Vin in this study—4 wt% instead of 3 wt%. This rise in EE is attributed to the modification of the protocol used to prepare  $\epsilon$ Vin-loaded onions. Indeed, based on Crauste-Manciet work on onion-type MLLs, the protocol for lamellar phase hydration was changed. Instead of hydrating with the whole volume of water, it was fractioned in two equal parts and shearing was applied after each water addition (see Section 2.2.). Crauste-Manciet et al. demonstrated that this fractioning increased the proportion of onion-type MLLs as compared to unilamellar vesicles [32]. Considering an EE of  $80 \pm 4\%$ , the payload, i.e., the bioactive-to-lipid weight percentage [41] reached a value of 6.1% which is equal to the value found by Crauste-Manciet et al. for fisetin, a hydrophobic drug; 6.1%. Moreover, our value was larger than reported values usually below 3% for resveratrol-loaded liposomes [42]. Soo et al. reported, e.g., a loading of  $3.08 \pm 0.35\%$  in DPPC-Cholesterol liposomes [38].

##### 4.2. Comparison of Methods

All the separation methods present a major drawback when working with poorly water-soluble molecules. In this case, aggregation and eventually precipitation of the free molecules could occur. The formation of aggregates into the liposome dispersion would generate errors in the encapsulation ratio deduced from SEC, ultracentrifugation methods and adsorption filtration methods. For SEC, aggregates would elute in the first fractions with liposomes because of their size so that bioactive aggregates would be counted in the encapsulated fraction. For ultracentrifugation, aggregates would precipitate with liposomes introducing the same bias. For the proposed separation process, aggregates affinity for the filter could be different from the single molecules and/or if large enough, these aggregates could clog filter pores so that MLLs could be impeded to cross it. Precipitation of the bioactive is likely to happen in kinetics study because of the release of the biomolecule. For the adsorption filtration method, a solution to avoid this bias is to achieve mild centrifugation (500 rpm, 10 min) before separation to fasten aggregates sedimentation without affecting liposomes dispersion, which is checkable by measuring the dispersion

turbidity at 436 nm; it should remain identical to its day-1 value. The supernatant, devoid of aggregates, and still containing the MLLs, can then be analyzed. This was achieved for our kinetics study.

SEC displays several other drawbacks. Firstly, to avoid the retention of part of the bioactive-loaded liposomes in the gel, a saturation of the column gel with usually plain (empty) liposomes has to be achieved. This requires the supplemental preparation of liposomes without bioactive, and also their characterization since their size must be comparable to their bioactive-loaded counterparts, as was the case for us (see Section 3.1). Secondly, samples are diluted by their passage through the column so that the concentration of the bioactive must be large enough to be detectable after elution. A total of 10 mg of  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs was used in our case. Thirdly, elution may take a long time (in our case about 1 h). Fourthly, each collected fraction is to be analyzed to detect in which liposomes the bioactive was present, which lengthens the experiment duration. Eventually, in some cases, the molecule displays a strong affinity for the gel so that an organic solvent is employed to elute the molecule of interest; the gel may be impaired and a new column has to be prepared for successive separations. This was the case for  $\epsilon$ Vin, which is why the EE was calculated only from the aqueous fractions, those containing  $\epsilon$ Vin-loaded MLLs.

Ultracentrifugation also presents several disadvantages. When the density of liposomes is not so different from water, e.g., for uni-lamellar liposomes, high rate and long times (more than 1 h) must be applied to hope to separate them from the free molecule. In a recent work, Gonzalez Gomez et al. showed that centrifugation was not always successful in separating liposomes from the free molecule, in their case antibiotics, and that high speeds could result in the disruption of liposomes [26]. Moreover, ultracentrifuge is an expensive laboratory experiment.

Compared to SEC and ultracentrifugation, the adsorption filtration method is more rapid (roughly 10 min) allowing its use for “real time” evaluation of release kinetics. It is also very cheap—only one syringe filter was needed and 2 mg of MLLs was sufficient. This implies that a very low amount of bioactive, usually expensive, is necessary. It is adapted to any molecule and type of capsule as long as (i) the filter pore size is much larger than the liposome size, (ii) liposomes display poor affinity for the filters, and (iii) the molecule displays strong affinity for the filters.

Direct filtration, i.e., filtration aimed to retain the liposomes and to let the molecule of interest pass through the filter, obviously presents the same advantages as the proposed method. However, in some cases, it is difficult to find a membrane for which the molecule has no affinity for, like the polyphenol we used (Figure 4a). Moreover, in the case where the liposomes are deformable, some of them could pass through filters, or could be de-structured through their passage. In a recent study on MLLs, Touti et al. demonstrated that up to 30% of MLLs composed of a mixture of phosphatidylcholine and Tween 80 went through filters with pores smaller than MLL size, because of their elasticity [36]. Moreover, disruption of MLLs in uni-lamellar liposomes is likely to occur since uni-lamellar liposomes are generally obtained by extrusion, i.e., filtration of MLLs through membranes having calibrated pores smaller than MLL ones [43]. This change in liposome morphology would affect their EE. Filtrating liposomes through large pores, as in the adsorption filtration, avoids these drawbacks.

The proposed method is then adapted for the screening of liposomes formulations but also for the study of fast release kinetics. Nevertheless, as a separation technique, ultracentrifugation should be preferred for large volumes.

## 5. Conclusions

An encapsulation efficiency of  $80 \pm 4\%$  was obtained for  $\epsilon$ Vin encapsulation in multi-lamellar liposomes. The payload of this resveratrol dimer was then found to be much higher than the reported resveratrol one. EE was measured thanks to the separation of liposomes from the free  $\epsilon$ Vin using two classical techniques and a novel adsorption filtration technique we detailed. This simple, cheap and rapid method could be employed

to liposomes but also to any kind of capsule and encapsulated molecule as long as filters are well chosen.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13040566/s1>, Figure S1. Validation of the spectrophotometric method and calibration curve of  $\epsilon$ Vin in MetOH:water (1:1). Linearity:  $y = 0.0556x + 0.0148$  with  $R^2 = 0.9982$ . LOD = 0.87 mg/L, LOQ = 2.64 mg/L. Recovery: 103.2% for a concentration of  $\epsilon$ Vin 10  $\mu$ g/mL. Precision: <5% for a concentration of  $\epsilon$ Vin 10  $\mu$ g/mL. Figure S2. Number representation of the size distribution of  $\epsilon$ -viniferin loaded MLLs. Table S1. Effect of MLLs concentration on the retention percentage of 5  $\mu$ m-sized PVDF filters.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.F., P.B., S.K., A.C.; methodology, C.F. and P.B.; formal analysis, C.F. and P.B.; investigation, C.F. and P.B.; writing—original draft preparation, C.F. and P.B.; writing—review and editing, C.F., P.B., A.C., T.R., S.K.; supervision, C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available within the article.

**Acknowledgments:** UHPLC equipment was kindly provided by the Bordeaux Metabolome Facility and supported by MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Gibbs, B.F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C.N. Encapsulation in the Food Industry: A Review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1999**, *50*, 213–224.
- Barroso, L.; Viegas, C.; Vieira, J.; Ferreira-Pêgo, C.; Costa, J.; Fonte, P. Lipid-Based Carriers for Food Ingredients Delivery. *J. Food Eng.* **2021**, *295*, 110451. [[CrossRef](#)]
- Tomaro-Duchesneau, C.; Saha, S.; Malhotra, M.; Kahouli, I.; Prakash, S. Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceuticals: Current Status and Future Directions. *J. Pharm.* **2013**, *2013*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, M.N.; Hemant, K.S.Y.; Ram, M.; Shivakumar, H.G. Microencapsulation: A Promising Technique for Controlled Drug Delivery. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, *5*, 65–77.
- Pantschwa, J.M.; Kondiah, P.P.D.; Choonara, Y.E.; Marimuthu, D.; Pillay, P. Nanodrug Delivery Systems for the Treatment of Ovarian Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 213. [[CrossRef](#)]
- Vemmer, M.; Patel, A.V. Review of Encapsulation Methods Suitable for Microbial Biological Control Agents. *Biol. Control* **2013**, *67*, 380–389. [[CrossRef](#)]
- Ahmad, R.; Srivastava, S.; Ghosh, S.; Khare, S.K. Phytochemical Delivery through Nanocarriers: A Review. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *197*, 111389. [[CrossRef](#)]
- Lee, M.-K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 264. [[CrossRef](#)]
- Maritim, S.; Boulas, P.; Lin, Y. Comprehensive Analysis of Liposome Formulation Parameters and Their Influence on Encapsulation, Stability and Drug Release in Glibenclamide Liposomes. *Int. J. Pharm.* **2021**, *592*, 120051. [[CrossRef](#)]
- Tian, M.-P.; Song, R.-X.; Wang, T.; Sun, M.-J.; Liu, Y.; Chen, X.-G. Inducing Sustained Release and Improving Oral Bioavailability of Curcumin via Chitosan Derivatives-Coated Liposomes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 702–710. [[CrossRef](#)]
- Courtois, A.; Garcia, M.; Krisa, S.; Atgié, C.; Sauvart, P.; Richard, T.; Faure, C. Encapsulation of Viniferin in Onion-Type Multi-Lamellar Liposomes Increases Its Solubility, Its Photo-Stability and Decreases Its Cytotoxicity on Caco-2 Intestinal Cells. *Food Funct.* **2019**, *10*, 2573–2582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rivière, C.; Pawlus, A.D.; Mérillon, J.-M. Natural Stilbenoids: Distribution in the Plant Kingdom and Chemotaxonomic Interest in Vitacea. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1317–1333. [[CrossRef](#)]
- El Khawand, T.; Courtois, A.; Valls, J.; Richard, T.; Krisa, S. A Review of Dietary Stilbenes: Sources and Bioavailability. *Phytochem. Rev.* **2018**, *17*, 1007–1029. [[CrossRef](#)]
- Privat, C.; Telo, J.P.; Bernardes-Genisson, V.; Vieira, A.; Souchard, J.-P.; Nepveu, F. Antioxidant Properties of Trans- $\epsilon$ -Viniferin As Compared to Stilbene Derivatives in Aqueous and Nonaqueous Media. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1213–1217. [[CrossRef](#)]

15. Nassra, M.; Krisa, S.; Papastamoulis, Y.; Kapche, G.D.; Bisson, J.; André, C.; Konsman, J.P.; Schmitter, J.-M.; Mérillon, J.-M.; Waffo-Tégou, P. Inhibitory Activity of Plant Stilbenoids against Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Planta Med.* **2013**, *79*, 966–970. [[CrossRef](#)]
16. Billard, C.; Izard, J.-C.; Roman, V.; Kern, C.; Mathiot, C.; Mentz, F.; Kolb, J.-P. Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of Resveratrol,  $\epsilon$ -Viniferin and Vine-Shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1991–2002. [[CrossRef](#)]
17. Caillaud, M.; Guillard, J.; Richard, D.; Milin, S.; Chassaing, D.; Paccalin, M.; Page, G.; Rioux Bilan, A. Trans  $\epsilon$  Viniferin Decreases Amyloid Deposits and Inflammation in a Mouse Transgenic Alzheimer Model. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212663. [[CrossRef](#)]
18. Vion, E.; Page, G.; Bourdeaud, E.; Paccalin, M.; Guillard, J.; Rioux Bilan, A. Trans  $\epsilon$ -Viniferin Is an Amyloid- $\beta$  Disaggregating and Anti-Inflammatory Drug in a Mouse Primary Cellular Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **2018**, *88*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ohara, K.; Kusano, K.; Kitao, S.; Yanai, T.; Takata, R.; Kanauchi, O.  $\epsilon$ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, Prevents Diet-Induced Obesity in Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 877–882. [[CrossRef](#)]
20. Courtois, A.; Atgié, C.; Marchal, A.; Hornedo-Ortega, R.; Lapèze, C.; Faure, C.; Richard, T.; Krisa, S. Tissue Distribution and Metabolism of Trans- $\epsilon$ -Viniferin after Intraperitoneal Injection in Rat. *Nutrients* **2018**, *10*, 1660–1671. [[CrossRef](#)]
21. Kim, J.; Min, J.S.; Kim, D.; Zheng, Y.F.; Mailar, K.; Choi, W.J.; Lee, C.; Bae, S.K. A Simple and Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Trans- $\epsilon$ -Viniferin Quantification in Mouse Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Mice. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *134*, 116–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wallace, S.J.; Li, J.; Nation, R.L.; Boyd, B.J. Drug Release from Nanomedicines: Selection of Appropriate Encapsulation and Release Methodology. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2012**, *2*, 284–292. [[CrossRef](#)]
23. Wagner, A.; Vorauer-Uhl, K.; Katinger, H. Liposomes Produced in a Pilot Scale: Production, Purification and Efficiency Aspects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 213–219. [[CrossRef](#)]
24. Pattnaik, P.; Ray, T. Improving Liposome Integrity and Easing Bottlenecks to Production. *Pharm. Technol. Eur.* **2009**, *22*, 24–28.
25. Zhu, J.; Wang, Q.; Li, H.; Zhang, H.; Zhu, Y.; Omari-Siaw, E.; Sun, C.; Wei, Q.; Deng, W.; Yu, J.; et al. Galangin-Loaded, Liver Targeting Liposomes: Optimization and Hepatoprotective Efficacy. *Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *46*, 339–347. [[CrossRef](#)]
26. Gonzalez Gomez, A.; Saifuddin, S.; Marshall, K.; Hosseinioust, Z. Liposomal Nanovesicles for Efficient Encapsulation of Staphylococcal Antibiotics. *ACS Omega* **2019**, *4*, 10866–10876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Magenheimer, B.; Levy, M.Y.; Benita, S. A New in Vitro Reqnique for the Evaluation of Drug Release Profile from Colloidal Carriers—Ultrafiltration Technique at Low Pressure. *Int. J. Pharm.* **1993**, *94*, 115–123. [[CrossRef](#)]
28. Perkins, W.R.; Minchey, S.R.; Ahl, P.L.; Janoff, A.S. The Determination of Liposome Captured Volume. *Chem. Physcis Lipids* **1993**, *64*, 197–217. [[CrossRef](#)]
29. Ruysschaert, T.; Marque, A.; Duteyrat, J.L.; Lesieur, S.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Liposome Retention in Size Exclusion Chromatography. *BMC Biotechnol.* **2005**, *5*, 11. [[CrossRef](#)]
30. Chaudhary, D.S.; Vigneswaran, S.; Ngo, H.H.; Shim, W.G.; Moon, H. Biofilter in Water and Wastewater Treatment. *Korean J. Chem. Eng.* **2003**, *20*, 1054–1065. [[CrossRef](#)]
31. Biais, B.; Krisa, S.; Cluzet, S.; Da Costa, G.; Waffo-Tégou, P.; Mérillon, J.-M.; Richard, T. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4952–4960. [[CrossRef](#)]
32. Crauste-Manciet, S.; Larquet, E.; Khawand, K.; Bessodes, M.; Chabot, G.G.; Brossard, D.; Mignet, N. Lipidic Spherulites: Formulation Optimisation by Paired Optical and Cryoelectron Microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 1088–1094. [[CrossRef](#)]
33. Diat, O.; Roux, D.; Nallet, F. Effect of Shear on a Lyotropic Lamellar Phase. *J. Phys. II* **1993**, *3*, 1427–1452. [[CrossRef](#)]
34. Rouser, G.; Fkeischer, S.; Yamamoto, A. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1970**, *5*, 494–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Olea, D.; Faure, C. Quantitative Study of the Encapsulation of Glucose Oxidase into Multilamellar Vesicles and Its Effect on Enzyme Activity. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 6111–6118. [[CrossRef](#)]
36. Touti, R.; Noun, M.; Guimberteau, F.; Lecomte, S.; Faure, C. What Is the Fate of Multi-Lamellar Liposomes of Controlled Size, Charge and Elasticity in Artificial and Animal Skin? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *151*, 18–31. [[CrossRef](#)]
37. Isailović, B.D.; Kostić, I.T.; Zvonar, A.; Đorđević, V.B.; Gašperlin, M.; Nedović, V.A.; Bugarski, B.M. Resveratrol Loaded Liposomes Produced by Different Techniques. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2013**, *19*, 181–189. [[CrossRef](#)]
38. Soo, E.; Thakur, S.; Qu, Z.; Jambhrunkar, S.; Parekh, H.S.; Popat, A. Enhancing Delivery and Cytotoxicity of Resveratrol through a Dual Nanoencapsulation Approach. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *462*, 368–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dorrington, G.; Chmel, N.P.; Norton, S.R.; Wemyss, A.M.; Lloyd, K.; Amarasinghe, D.P.; Rodger, A. Light Scattering Corrections to Linear Dichroism Spectroscopy for Liposomes in Shear Flow Using Calcein Fluorescence and Modified Rayleigh-Gans-Debye-Mie Scattering. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1385–1399. [[CrossRef](#)]
40. Matsuzaki, K.; Murase, O.; Sugishita, K.; Yoneyama, S.; Akada, K.; Ueha, M.; Nakamura, A.; Kobayashi, S. Optical Characterization of Liposomes by Right Angle Light Scattering and Turbidity Measurement. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 219–226. [[CrossRef](#)]
41. Xu, X.; Khan, M.A.; Burgess, D.J. A Quality by Design (QbD) Case Study on Liposomes Containing Hydrophilic API. II. Screening of Critical Variables, and Establishment of Design Space at Laboratory Scale. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 543–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- 
42. Amri, A.; Chaumeil, J.C.; Sfar, S.; Charrueau, C. Administration of Resveratrol: What Formulation Solutions to Bioavailability Limitations? *J. Control. Release* **2012**, *158*, 182–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  43. Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G.; Cullis, P.R. Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure. Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *812*, 55–65. [[CrossRef](#)]

### **1.5 Conclusions sur la méthode de séparation par filtration**

Après avoir amélioré le taux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs (section 1.2), nous avons développé une nouvelle méthode de mesure du taux d'encapsulation. Des techniques de filtration par rétention des liposomes existent déjà, mais sont difficilement applicables aux objets déformables, qui peuvent alors passer au travers des filtres [223]. Cette méthode, basée sur l'adsorption, permet alors de retenir les molécules non-encapsulées et d'éluer la suspension de MLLs.

Cette nouvelle technique a plusieurs avantages. Premièrement, elle permet de s'affranchir des **erreurs de mesures liées aux agrégats** d' $\epsilon$ -viniférine non encapsulée. La molécule encapsulée étant lipophile, sa fuite en milieu aqueux entraîne son agrégation, pouvant fausser le dosage des composés encapsulés en éluant avec les MLLs dans la méthode de chromatographie par exclusion de taille, ou en précipitant dans la méthode d'ultracentrifugation. Deuxièmement, cette méthode est **peu coûteuse en matière**, c'est-à-dire en MLLs nécessaires à une mesure. Dans ce contexte, seulement 2 mg de MLLs sont nécessaires, pour 10 mg avec la méthode de chromatographie d'exclusion de taille, et 10 mg minimum pour la méthode d'ultracentrifugation. Enfin, la détermination du taux d'encapsulation avec cette méthode est **rapide**. Le taux d'encapsulation est déterminé en 10 minutes, quand il faut au minimum 1 heure pour séparer les molécules encapsulées dans les deux autres méthodes, en plus du temps nécessaire au dosage des solutions.

Ces trois avantages, et plus particulièrement la rapidité de la nouvelle méthode, permettent de faire des mesures régulièrement, et ainsi réaliser des tests de stabilité des MLLs. Enfin, cette méthode est en théorie applicable à d'autre type de nano-objets, comme à d'autres molécules encapsulées, dans la mesure où les taux de rétention et de saturation des filtres utilisés sont préalablement déterminés.

## 2. Mesure de la stabilité des MLLs dans différentes matrices

### 2.1 Stabilité des MLLs suspendus en solution aqueuse

Pour suivre la stabilité des MLLs, ceux-ci ont été caractérisés en termes de morphologie, taille et charge de surface, avant d'être suspendus dans l'eau Milli-Q à une concentration de 1 mg/mL. Le taux d'encapsulation a été mesuré régulièrement durant 70 jours, en faisant subir à la suspension une légère centrifugation (500 rpm, 10 min) avant la mesure.

D'après l'évolution du taux d'encapsulation dans le temps (Figure 5, de la publication page 104), il semblerait que les MLLs aient été relativement stables dans la mesure où après 77 jours, 31% de l' $\epsilon$ -viniférine initialement encapsulée a fui des MLLs. La suspension de MLLs dans l'eau est relativement stable, et permet donc de pouvoir stocker les MLLs en suspension dans l'eau, sans craindre de dégradation.

### 2.2 Stabilité des MLLs dans un milieu réactionnel

Les MLLs contenant l' $\epsilon$ -viniférine ont été mis au contact de fractions hépatiques de rat et d'humain (fractions S9, Biopredic International, Saint-Grégoire, France) afin d'en mesurer le métabolisme, et de le comparer à celui l' $\epsilon$ -viniférine non encapsulée.

#### 2.2.1 Stabilité des objets dans le milieu réactionnel

La stabilité des MLLs dans le milieu réactionnel nécessaire aux expériences de métabolisme *in vitro* a dans un premier temps été déterminée. Les évolutions de la taille et du taux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine ont été déterminées dans un milieu de réaction nécessaire au métabolisme *in vitro*, à savoir 5 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de dithiothréitol, 50 mM de Tris (pour un pH ajusté à 7,4 avec une solution d'HCl), durant 40 et 90 minutes.

D'après les résultats d'analyse du diamètre moyen des objets (Figure 25, A) et les calculs du taux d'encapsulation (Figure 25, B) ; il semblerait que le milieu de suspension n'ait pas d'impact significatif sur la taille des MLLs. Le taux d'encapsulation ne varie pas de manière significative après incubation dans le milieu réactionnel.

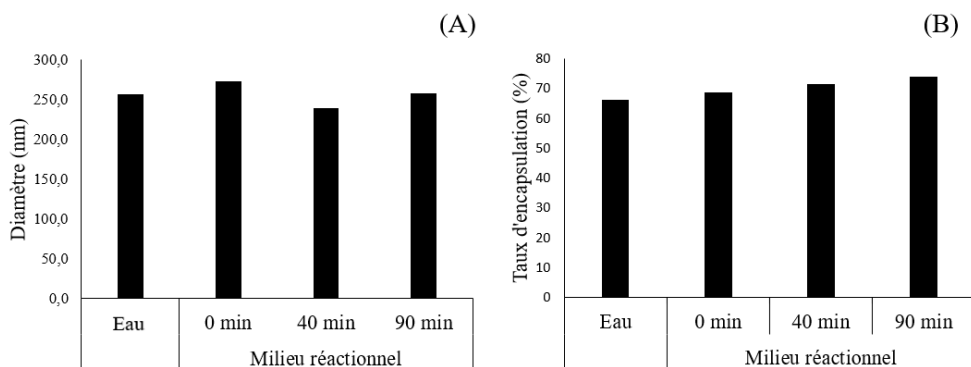


Figure 25. Stabilité des MLLs dans l'eau et le milieu réactionnel

Comparaison du diamètre (A) et du taux d'encapsulation (B) de l' $\epsilon$ -viniférine dans les de MLLs après suspension dans l'eau, le milieu réactionnel, ou le milieu réactionnel après 40 et 90 min d'incubation à 37°C.

Cette suspension est donc stable en milieu réactionnel. En effet, les MLLs contenant l' $\epsilon$ -viniférine ont conservé leur intégrité et leur taux d'encapsulation dans des conditions expérimentales relativement proches des conditions physiologiques (37°C, pH 7,4). Cette mesure de stabilité a permis de réaliser des tests de biotransformation de l' $\epsilon$ -viniférine encapsulée au contact d'enzymes du métabolisme en s'affranchissant de l'hypothèse de dégradation des MLLs causée par le milieu réactionnel.

### **2.3 Impact de l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur son métabolisme *in vitro***

Les expériences de glucuronidation *in vitro* ont été réalisées en comparant l' $\epsilon$ -viniférine libre et encapsulée. Pour s'assurer que les concentrations exposées aux fractions hépatiques soient les mêmes, les solutions de molécules libres et encapsulées (après passage sur filtre PVDF) ont été analysées en UPLC couplée à une barrette de diode et un spectromètre de masse (DAD-MS) avec la méthode présentée dans la publication page 105, et ajustées si besoin.

L' $\epsilon$ -viniférine (concentration finale de 100  $\mu$ M) a été mise au contact des fractions hépatiques de rat et d'humain (2 mg/mL), d'alaméthicine (25  $\mu$ g/mL), d'UDPGA (100  $\mu$ M) dans un volume final de 100  $\mu$ L. Toutes les expériences ont été réalisées en 4 réplicats et dans la glace. Les réactions de glucuronidation ont été initiées en plongeant les échantillons dans un bain-marie à 37 °C durant 40 minutes, puis stoppées par ajout de 100  $\mu$ L de méthanol glacé. Après centrifugation, (30 minutes, 10 000g, 4 °C) les surnageants ont été analysés en UPLC-DAD-MS. L'analyse du chromatogramme a été réalisée à une longueur d'onde de 320 nm. Une condition « témoin » a été réalisée en incubant l' $\epsilon$ -viniférine en l'absence des fractions hépatiques et du cosubstrat, et représente l' $\epsilon$ -viniférine non métabolisée.

Les 4 isomères de l' $\epsilon$ -viniférine glucuronidée ont été numérotés par ordre d'élution (Figure 26). Le profil métabolique (proportion de chacun des 4 glucuronides) ne diffère pas selon la forme de la molécule (libre ou encapsulée) et sont en accord avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire [140]. En effet, les fractions hépatiques de rat forment très majoritairement de l' $\epsilon$ -viniférine-glucuronide-1 (nommé VG1), quand les fractions humaines forment de l' $\epsilon$ -viniférine-glucuronide 1 et 4 (VG1 et VG4). Bien que chaque glucuronide ait été quantifié individuellement, les aires des pics des 4 formes ont été additionnés pour simplifier la lecture des résultats.



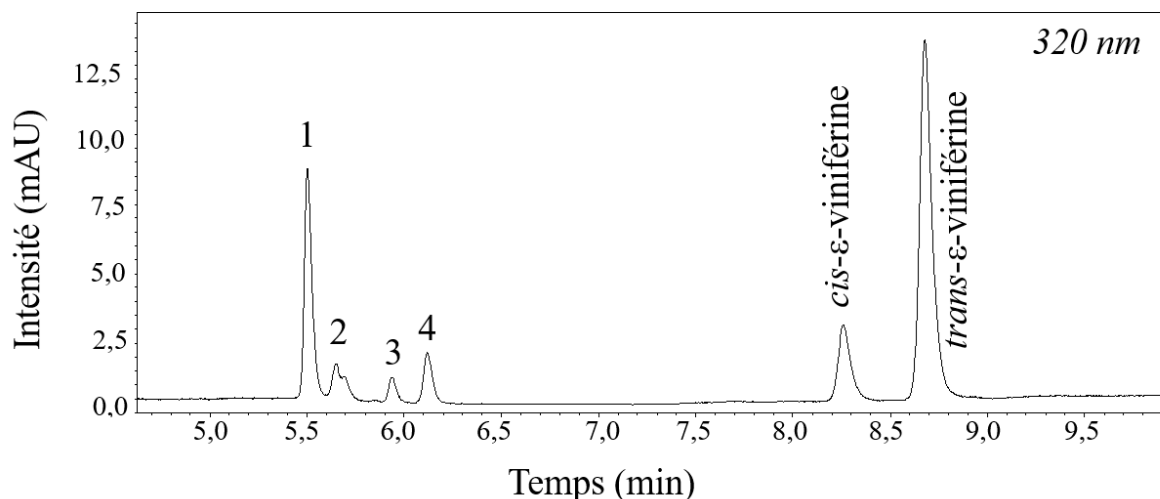


Figure 26. Chromatogramme UPLC-DAD à 320 nm d'une réaction de glucuronidation in vitro avec des fractions hépatiques de rat.

Les 4 isomères de l' $\epsilon$ -viniférine sont numérotés de 1 à 4 par ordre d'éluion.

Concernant les fractions hépatiques de rat, l' $\epsilon$ -viniférine est significativement moins métabolisée lorsque la molécule était exposée sous forme encapsulée ( $34,3 \pm 1,1$  % d' $\epsilon$ -viniférine) que sous sa forme libre ( $25,8 \pm 0,5$  % d' $\epsilon$ -viniférine). Pour les fractions hépatiques humaines, la même tendance a été constatée :  $72,2 \pm 3,7$  % d' $\epsilon$ -viniférine non métabolisée pour la molécule sous forme encapsulée, contre  $49,6 \pm 2,7$  % pour la molécule sous forme libre. De plus, pour les fractions hépatiques humaines, la concentration en  $\epsilon$ -viniférine-glucuronides totaux après exposition à la molécule encapsulée ( $37,3 \pm 0,6$  %) était significativement inférieure par comparaison à l'exposition de la molécule sous sa forme libre ( $46,4 \pm 2,2$  %).

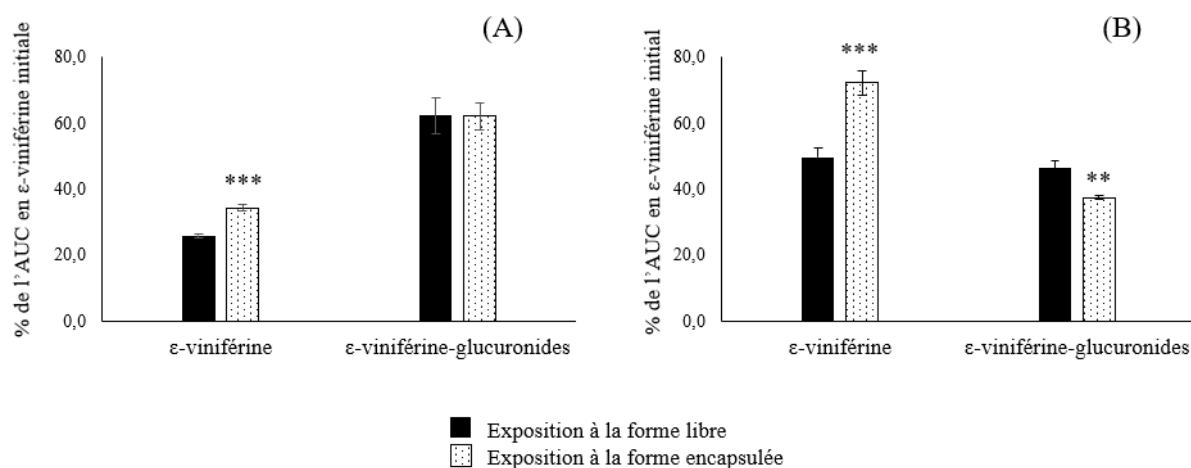


Figure 27. Dosage de l' $\epsilon$ -viniférine et total des  $\epsilon$ -viniférine-glucuronides après expositions à des fractions hépatiques.

Fractions hépatiques de rat (A) et d'humain (B) de la forme libre ou encapsulée dans les MLLs (\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 0,0005$ , test de Student).

L'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine semble donc **diminuer son accessibilité** aux enzymes. En effet, l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs permettrait de limiter sa glucuronidation au contact de fractions hépatiques. Ces résultats montrent que l'encapsulation aurait une action protectrice contre les enzymes du métabolisme dans ces conditions expérimentales. En effet, s'agissant de fractions hépatiques utilisées *in vitro*, l'extrapolation à l'échelle de l'organisme est difficile dans la mesure où MLLs n'ont pas subi les étapes en amont du métabolisme hépatique, à savoir le passage dans les différentes parties du système digestif, ainsi que l'absorption intestinale. Des études *in vitro* avec l'utilisation de milieux modèles gastro-intestinaux (réalisées aux CBMN) ont montré une bonne stabilité des MLLs en milieu modèle gastrique, et une détérioration progressive de ceux-ci en milieu intestinal, ce qui nous laisse penser que les MLLs n'atteignent pas les hépatocytes dans leur forme initiale.

## **Conclusions générales du volume I**

Ce premier volume de thèse était consacré à l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs. Les expériences menées en collaboration avec le CBMN (Bordeaux) ont permis de produire et caractériser ces MLLs.

- ❖ Nous avons **amélioré le taux d'encapsulation** de l' $\epsilon$ -viniférine en optimisant les paramètres de production des MLLs.

La molécule à encapsuler étant lipophile, l'utilisation de nano-objets constitués de plusieurs couches phospholipidiques permet, à la différence des liposomes unilamellaires, d'obtenir un taux d'encapsulation élevé. L'optimisation du protocole de fabrication a permis d'améliorer ce taux par rapport aux précédentes études.

- ❖ La mesure du taux d'encapsulation s'est faite par une **technique originale, rapide et peu coûteuse en matière.**

La méthode nouvellement développée, basée sur l'adsorption, permet de séparer les molécules non-encapsulées par filtration. De ce fait, le taux d'encapsulation a pu, grâce à cette méthode, être déterminé plus rapidement qu'avec les méthodes conventionnelles.

- ❖ Les MLLs produits sont **stables dans différents modèles *in vitro*.**

Les études *in vitro* réalisées dans cette partie ont permis de mesurer la stabilité des MLLs produits. La méthode de mesure du taux d'encapsulation a été appliquée pour suivre l'évolution du taux d'encapsulation des MLLs, dans un premier temps dans l'eau, puis dans une solution proche des conditions physiologiques.

*Une fois ces trois résultats obtenus, des productions à plus grandes échelles ont pu être entreprises dans le but de réaliser une étude *in vivo* sur rat, qui constitue le deuxième volume de cette thèse.*

## **Volume II**

*Quantification de l' $\epsilon$ -viniférine et ses  
métabolites glucuronidés dans le plasma et les  
tissus de rat après administration orale de la  
molécule libre et encapsulée*

## Introduction

Bien qu'elle ait montré des propriétés biologiques intéressantes *in vivo*, l' $\epsilon$ -viniférine est un stilbène peu biodisponible, notamment du fait de sa faible absorption intestinale [255] et de son fort métabolisme [142]. Pour pallier à la faible biodisponibilité de certains polyphénols, de nombreuses études ces dernières années ont visé à déterminer l'impact de l'encapsulation de ces polyphénols sur leurs paramètres pharmacocinétiques après administration orale chez l'animal. Par exemple, comme cela a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'encapsulation du resvératrol peut améliorer ses paramètres pharmacocinétiques [245,247].

L'objectif principal de ce volume est d'évaluer **si l'administration d'une forme encapsulée d' $\epsilon$ -viniférine représente une piste intéressante pour améliorer ses paramètres pharmacocinétiques.**

Différents travaux réalisés précédemment dans notre équipe ont montré que l' $\epsilon$ -viniférine subit un fort métabolisme [1]. Ce métabolisme de phase II permet d'augmenter d'hydrophilicité des composés pour faciliter leur élimination par l'organisme. Plus particulièrement, une étude réalisée chez des rats ayant reçu une administration par voie IP d' $\epsilon$ -viniférine a permis d'identifier la présence des glucuronides *in vivo* [256]. Cependant, dans cette étude, les concentrations en glucuronides sont exprimées en équivalence d' $\epsilon$ -viniférine. En effet, les métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine ne sont pas commercialisés, ce qui rend leur quantification spécifique difficile.

Plusieurs méthodes sont possibles pour obtenir des molécules issues du métabolisme. La production de ces composés par utilisation de fractions hépatiques ou encore la production par hémisynthèse. La production de métabolites glucuronidés a d'ores et déjà été réalisée pour plusieurs polyphénols comme l'acide caféique, la quercétine ou encore le resvératrol [257–262].

## Objectifs

L'optimisation de la méthode de fabrication des MLLs (décrite dans le volume 1) a permis de produire à moyenne échelle de l' $\epsilon$ -viniférine encapsulée en quantité suffisante pour réaliser une étude *in vivo*. Nous avons donc dans ce volume deux objectifs.

Le premier est l'optimisation de la production par **hémisynthèse des 4 isoformes glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine** en améliorant les paramètres de la réaction et en optimisant la méthode de séparation par HPLC-semi-préparative des 4 molécules.

Le second est d'évaluer l'impact de **l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur ses paramètres pharmacocinétiques. Cet objectif sera atteint à l'aide d'une expérience réalisée sur des rats**, qui nécessite une étape préliminaire de **validation de méthode** d'extraction et de dosage de la molécule mère (l' $\epsilon$ -viniférine) et de l'un de ses glucuronides dans le plasma.

## 1. Optimisation de la production des métabolites glucuronidés par hémisynthèse

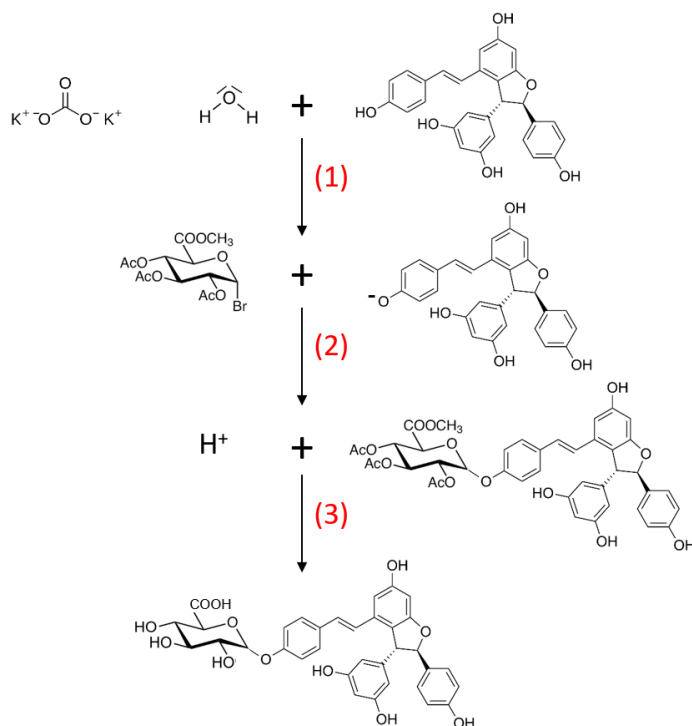
### 1.1 Stratégie, matériel et méthodes

La production des 4 isoformes glucuronidées a été réalisée par hémisynthèse, c'est-à-dire en partant de l' $\epsilon$ -viniférine. La réaction d'hémisynthèse s'est faite en trois étapes, schématisées en Figure 28 :

- l' $\epsilon$ -viniférine a dans un premier temps été dissoute dans l'éthanol ultrapure, et mis au contact d'une solution basique (constituée ici de  $K_2CO_3$  dissout dans l'eau). Le  $K_2CO_3$ , devenant  $2K^+ + CO_3^{2-}$  au contact de l'eau, déprotone les groupements hydroxyles de l' $\epsilon$ -viniférine ;

- dans un deuxième temps, de l'ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique dissout dans l'éthanol, est ajouté à la solution. Le carbone anomérique de l'ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique portant l'atome de brome subit donc l'attaque nucléophile d'une des fonctions phénols déprotonées de l' $\epsilon$ -viniférine *via* un mécanisme de type  $SN_1$ , libérant ainsi  $Br^-$  dans la solution ;

- enfin, la déprotection des fonctions hydroxyles et de la fonction acide du groupement acide glucuronique ajouté sur l' $\epsilon$ -viniférine a été réalisée *in situ* par le milieu alcalin. Avant le traitement du milieu réactionnel, le pH de celui-ci est diminué jusqu'à 5-6 par ajout d'acide formique.



La réaction d'hémisynthèse sur l' $\epsilon$ -viniférine permet de produire 4 isoformes glucuronidés, nommés VG1, VG2, VG3 et VF4 et dont les structures sont schématisées en Figure 29.

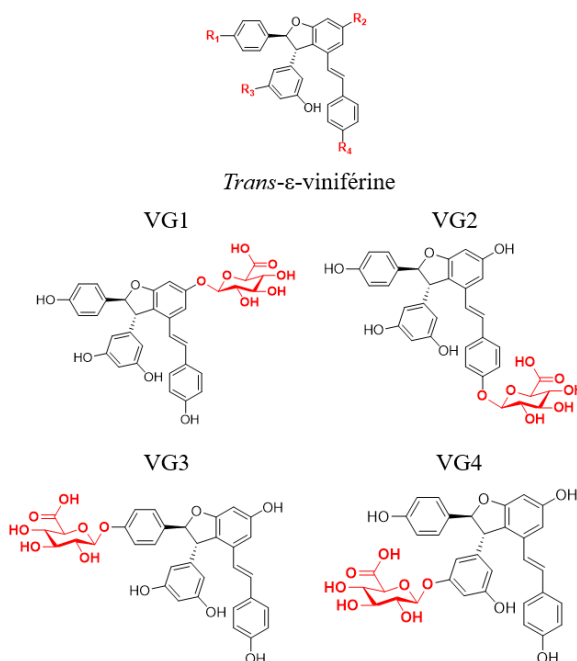


Figure 29. Structure des différents isomères de l' $\epsilon$ -viniférine glucuronidée

### 1.1.1 Optimisation des paramètres de la réaction d'hémisynthèse

La production des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine par hémisynthèse a été optimisée selon plusieurs paramètres :

- le temps de la réaction : de 1 h à 72 h ;
- la température : température ambiante (20 °C) et 50 °C ;
- l'agitation : avec agitation magnétique ou non ;
- la nature de la base : deux bases ont été testées pour leur capacité à arracher un proton des groupements hydroxyle de l' $\epsilon$ -viniférine (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

Les différentes conditions ont été réalisées sur des quantités d' $\epsilon$ -viniférine inférieures à 2 mg.

Une fois la base choisie, la quantité de celle-ci (en équivalence molaire d' $\epsilon$ -viniférine) et la quantité l'ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique ont été optimisées afin de déterminer les quantités optimales permettant la plus importante production de glucuronides. Pour ce faire, un plan expérimental à deux facteurs et trois niveaux a été réalisé, selon le design schématisé en Figure 30.

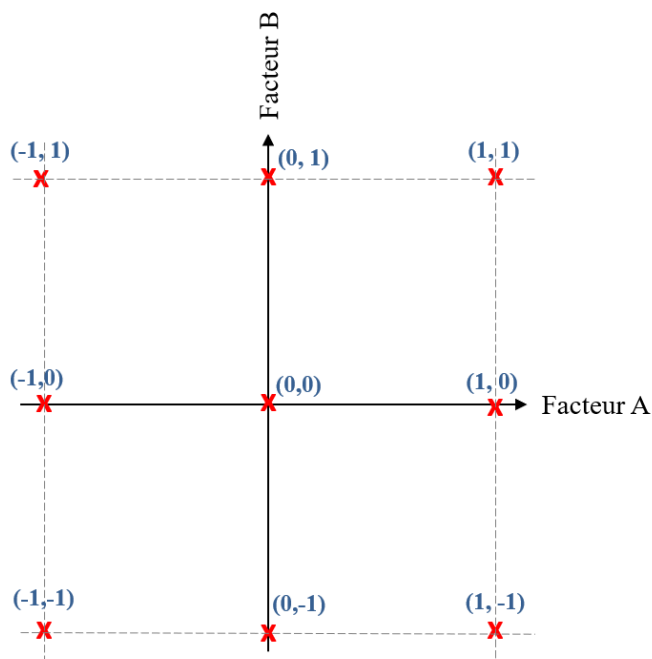


Figure 30. Design du plan factoriel à deux facteurs, utilisé pour optimiser la réaction d'hémisynthèse.

Ce plan expérimental permet alors de réaliser un nombre relativement restreint d'expériences (9 conditions différentes, dont une réalisée en triplicat, soit 11 réactions au total) et, à l'aide du logiciel Statgraphic, de modéliser la surface de réponse pour déterminer les paramètres optimaux. Après avoir fixé les valeurs minimales et maximales des paramètres, les différentes conditions à tester ont été calculées et sont indiquées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Conditions des expériences réalisées pour le plan expérimental. \*= point central

Nom	Coordonnées	Eq. Base	Eq. ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique	Base (mg)	Ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique (mg)
<b>A</b>	(0,0) *	12	6	3,65	5,25
<b>B</b>	(-1,1)	4	10	1,22	8,75
<b>C</b>	(-1,-1)	4	2	1,22	1,75
<b>D</b>	(0,-1)	12	2	3,65	1,75
<b>E</b>	(0,1)	12	10	3,65	8,75
<b>F</b>	(1,-1)	20	2	6,09	1,75
<b>G</b>	(-1,0)	4	6	1,22	5,25
<b>H</b>	(0,0) *	12	6	3,65	5,25
<b>I</b>	(1,0)	20	6	6,09	5,25
<b>J</b>	(1,1)	20	10	6,09	8,75
<b>K</b>	(0,0) *	12	6	3,65	5,25

A la fin des réactions, un volume de la réaction a été acidifié avec de l'acide formique et injecté en UPLC-DAD-MS avec la méthode préalablement établie et présentée dans la publication page 105 [140].



Les aires des pics correspondant aux 4 isoformes de l'ε-viniférine-glucuronide à la longueur d'onde de 320 nm ont été intégrés et additionnés. La somme de ces aires a été utilisée pour calculer le rendement de production ; et correspond à la réponse du plan d'expérience.

### 1.1.2 Purification des métabolites par HPLC semi-préparative

Une fois les paramètres de la réaction d'hémisynthèse optimisés, des productions à plus grande échelle (à partir de 30 mg d'ε-viniférine) ont été réalisées dans le but de purifier quelques milligrammes de chaque isoforme. Après avoir stoppé la réaction d'hémisynthèse, les solvants ont été évaporés avec un évaporateur rotatif sous vide. Le culot a été repris dans un volume d'eau ultrapure.

Une première étape de séparation par extraction liquide/liquide avec de l'acétate d'éthyle (3 cycles) a été réalisée dans une ampoule à décanter. Les phases organiques ont été réunies, évaporées et reprises dans un petit volume de solvant (méthanol:eau, 50:50, v:v) avant d'être injectées en HPLC-semi-préparative pour la purification des glucuronides.

La séparation des 4 métabolites glucuronidés par HPLC-semi-préparative couplée à un détecteur UV-VIS (Prostar 325, Varian, Palo Alto, CA, USA) a été optimisée, afin d'augmenter la quantité injectée et ainsi de diminuer le nombre d'injections nécessaires pour purifier la totalité de la production. Le choix des solvants a été l'un des paramètres d'optimisation. Le solvant A était de l'eau et plusieurs solvants B ont été testés : le méthanol, l'acétonitrile, le méthanol :eau (50 :50, v :v). De plus, plusieurs gradients ont été testés, faisant varier le pourcentage de départ de solvant B. Les fractions récoltées ont été analysées en UPLC-DAD-MS pour s'assurer de la pureté des pics à 320 nm.

## ***1.2 Résultats et discussion de l'optimisation de la production des glucuronides par hémisynthèse***

### 1.2.1 Détermination des paramètres de la réaction d'hémisynthèse

Lors de l'optimisation de la réaction, il a été montré que l'agitation permettait d'augmenter la production de glucuronides (données non montrées). La Figure 31 montre que l'utilisation d'une température à 50 °C permet d'améliorer la production. De plus, la base qui a permis l'obtention du meilleur ratio [air des glucuronides totaux] / [aire de l'ε-viniférine] était le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. En effet, pour les mêmes équivalences en potassium et césium, le ratio issu de la réaction avec le potassium avoisinait les 12%, quand celui avec le césium était à 9% (Figure 31). Enfin, la formation des glucuronides avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 50 °C semblait atteindre un plateau après 24 heures de réactions.

Les deux bases testées ont des électronégativités différentes, (0,82 et 0,79 pour le potassium et le césium, respectivement) ; et l'hydrogène ayant une électronégativité de 2,2, c'est donc le césium qui a une différence d'électronégativité plus importante, et donc hypothétiquement un pouvoir déprotonant plus important. De manière surprenante, l'utilisation

du césium n'a pas amélioré la production de glucuronidation. De plus, une diminution de l' $\epsilon$ -viniférine a été mise en évidence, avec la formation d'un nouveau composé de masse sur charge ( $m/z$ ) de 467, qui pourrait correspondre à un ajout de groupement méthyle. Une analyse en MS/MS et/ou une analyse en RMN du proton permettrait de déterminer la structure de ce composé.

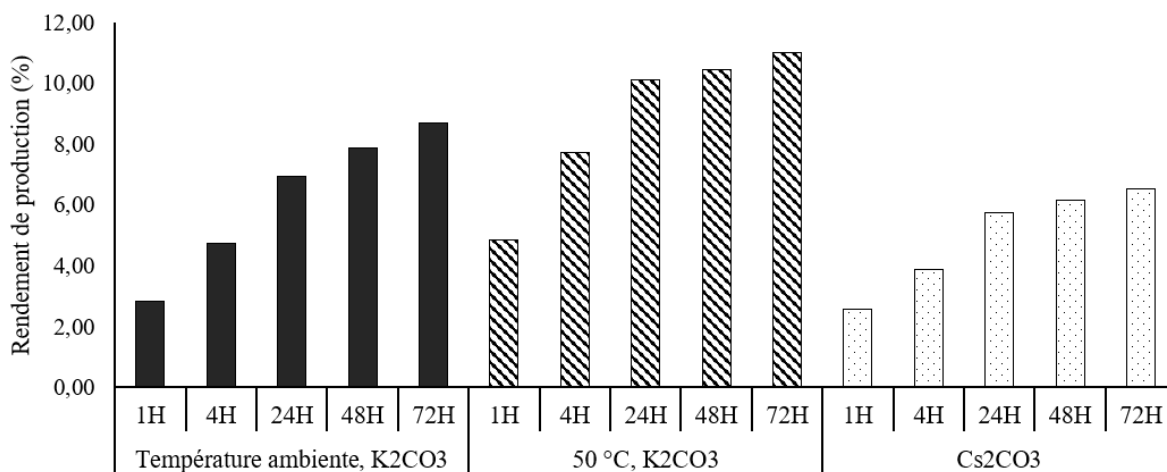


Figure 31. Réaction de glucuronidation par hémisynthèse (% des aires à 320 nm du total des glucuronides / aire de l' $\epsilon$ -viniférine) de trois expériences (potassium à température ambiante, potassium à 50°C, césium à 50°C)

Le plan d'expérience visant à optimiser les quantités de réactifs a par conséquent été réalisé, en fixant les autres paramètres à 24 heures de réaction, à 50 °C, sous agitation et avec utilisation du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

La somme des aires des pics correspondant aux 4 glucuronides et les différents paramètres testés ont permis de modéliser la surface de réponse (Figure 31). D'après les analyses réalisées grâce au logiciel Statgraphic, il semblerait que la quantité de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ait un impact positif et significatif sur la production de glucuronides (test ANOVA,  $p=0,0177$ ). En revanche, l'augmentation de l'ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique à lui seul n'explique pas l'augmentation du ratio des glucuronides ( $p=0,3103$ ). Il semblerait donc que ce soit l'étape de déprotonation de l' $\epsilon$ -viniférine qui soit limitante dans cette réaction.

Grâce à l'équation de la surface de réponse, les conditions optimales calculées étaient : 20 eq. de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 9,6 eq. d'ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique.

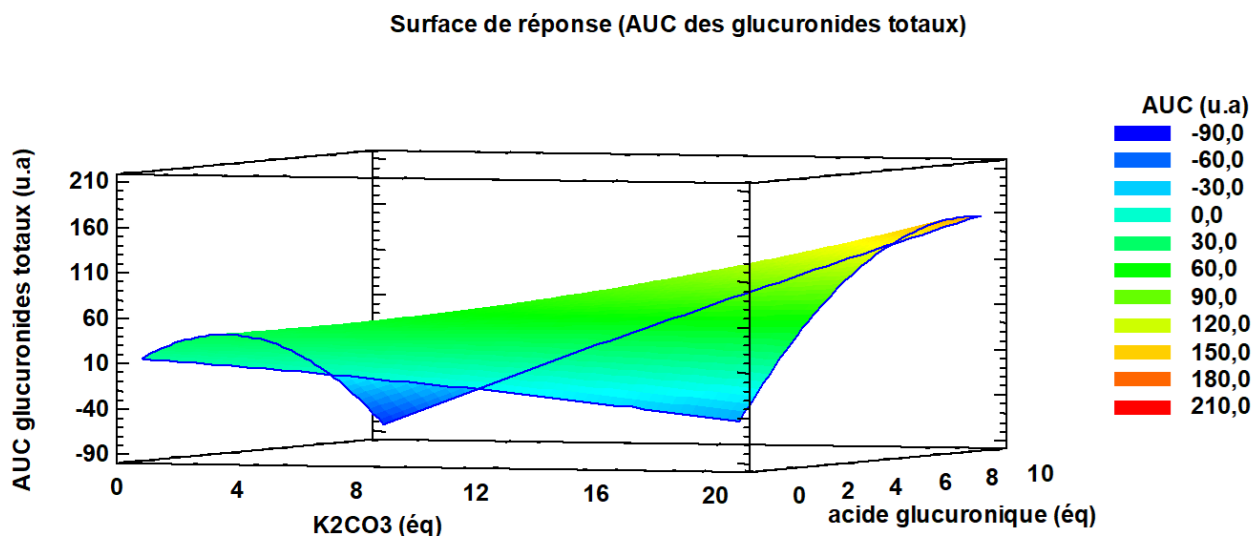


Figure 32. Surface de réponse du ratio des glucuronides totaux produits par hémisynthèse (AUC à 320 nm du total des 4 glucuronides)

Les conditions expérimentales de l'hémisynthèse ainsi définies permettent d'obtenir un rendement de production (calculé à partir des aires des pics = rendement théorique) de 12%. Les glucuronides ont alors été produits en quantité plus importante (à partir de 30 mg d' $\epsilon$ -viniférine) afin d'optimiser la méthode de séparation par HPLC-semi-préparative.

### 1.2.2 Purification des 4 isoformes glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine

La méthode de séparation en HPLC-semi-préparative a été optimisée en suivant l'élution des différents pics à 320 nm. Après avoir testé différents solvants, le couple de solvant qui permettait la meilleure séparation était l'eau et l'acétonitrile, tous les deux acidifiés à 0,025% d'acide trifluoroacétique. Plusieurs gradients ont été testés afin d'obtenir celui qui permettait la meilleure séparation des 4 glucuronides (Figure 33, A).

Il s'est avéré que VG1 était le métabolite majoritairement produit après hémisynthèse. Cette prédominance de VG1, dont le glucuronide se situe sur le carbone 13 du cycle A1 (R2, Figure 29, page 129 et Figure 34 page 135), pourrait s'expliquer par le faible encombrement stérique du groupement hydroxyle initial.

Les 4 glucuronides et  $\epsilon$ -viniférine non transformée ont été individuellement injectés en UPLC-DAD-MS (Figure 33, B). Les puretés, calculées sur la base du chromatogramme à 320 nm sont de 94,2%, 93,2% 97,0% et 97,2% pour VG1, VG2, VG3 et VG4, respectivement. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif sous vide, la lyophilisation de la solution aqueuse a permis d'obtenir les glucuronides sous forme de poudre.

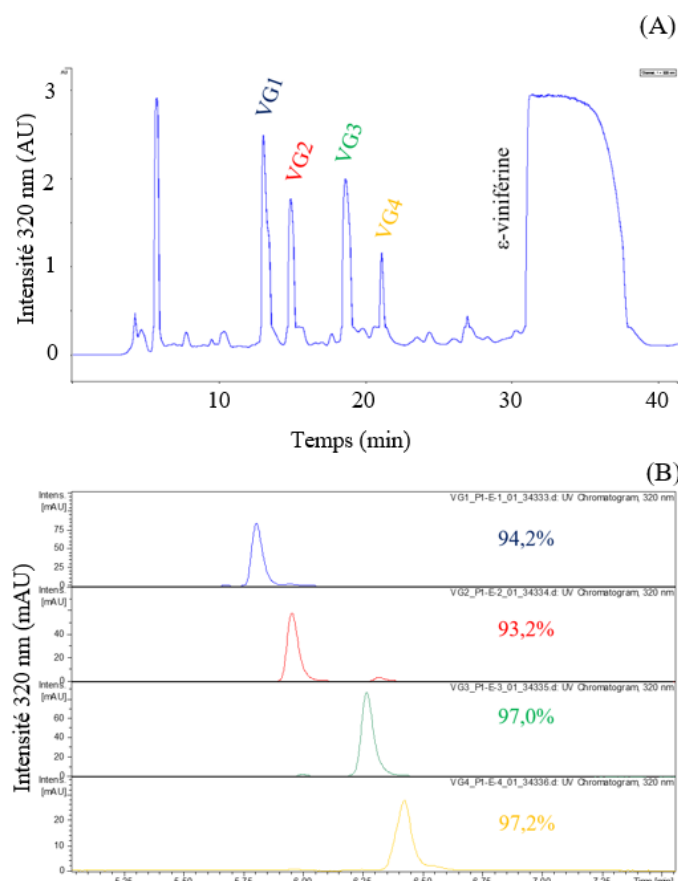


Figure 33. Chromatogramme à 320 nm de la production passée en HPLC-semi-préparative (A), et chromatogramme des pics récoltés en UPLC-DAD à 320 nm (B).

Une purification à partir de 100 mg d' $\epsilon$ -viniférine a ainsi permis d'obtenir 8,7 mg de VG1, 5,6 mg de VG2, 4,9 mg de VG3 et 3,5 mg de VG4. Ces masses obtenues permettent de calculer le rendement de la production à environ 23%, mais ce chiffre ne représente pas le rendement de la réaction d'hémisynthèse. En effet, ce rendement de réaction est sous-estimé, aux vues des pertes de matières durant les différentes étapes de purification, à savoir les évaporations, les injections en HPLC-semi-préparative et la lyophilisation.

Il existe une différence entre le rendement théorique de 12% et le rendement calculé à partir des pesées des poudres (23%). Cette différence est certainement due au coefficient d'absorption des glucuronides qui diffère de celui de l' $\epsilon$ -viniférine.

Bien que le ratio de glucuronides totaux produits en hémisynthèse soit inférieur à celui obtenu avec utilisation de fractions hépatiques (12% de glucuronidation contre 78% avec l'utilisation de fractions hépatiques de rat [140]), les réactions par hémisynthèse sont moins coûteuses et permettent l'obtention des 4 glucuronides.

L'optimisation de ces étapes de production et de purification nous ont donc permis de produire des quantités de glucuronides suffisantes pour la suite de notre travail.

## 2. Effet de l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur ses paramètres pharmacocinétiques et sa distribution tissulaire chez le rat

Au préalable de l'étude pharmacocinétique réalisée chez le rat après administration orale, une étape de validation de la méthode d'extraction et de quantification dans le plasma a été entreprise sur l' $\epsilon$ -viniférine et sa forme glucuronide principale, VG1, dont la structure est présentée en Figure 34. En effet, VG1 étant le composé majoritaire retrouvé *in vitro* après exposition de la forme native aux fractions hépatiques ; et *in vivo* chez le rat, il a donc été utilisé pour la validation de méthode.

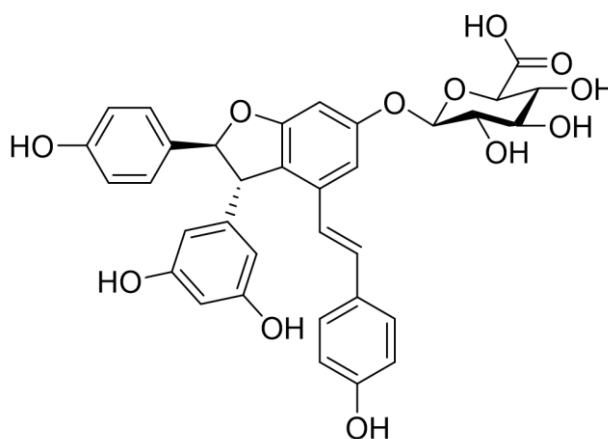


Figure 34. Structure de VG1

### 2.1 Validation de la méthode d'extraction et de quantification sur plasma

#### 2.1.1 Matériel et méthodes

Plusieurs paramètres ont été mesurés pour valider la méthode d'extraction et de quantification de l' $\epsilon$ -viniférine et de VG1 sur le plasma de rat. La validation de méthode s'est faite en se basant sur les lignes directrices de l'agence européennes de médecine ainsi que sur celles des Etats-Unis [263,264]. L'analyse des échantillons a été réalisée en UPLC couplée à un spectromètre de masse à haute résolution de type *Exactive benchtop Orbitrap mass spectrometer heated electrospray ionization (HESI)*, dont les paramètres de masse ont été préalablement optimisés. Pour chaque échantillon, les chromatogrammes des ions correspondants aux masses attendues (masse sur charge  $m/z$  de 453,1343 et 629,1664 pour l' $\epsilon$ -viniférine et les glucuronides, respectivement) ont été générés *via* le logiciel XCalibur. Les pics correspondant aux composés ont été intégrés et les concentrations calculées grâce aux courbes de calibrations établies avec l' $\epsilon$ -viniférine et VG1 (précédemment purifié).

Les extractions sur plasma ont été réalisées comme indiqué ci-après : après décongélation progressive dans la glace, 120  $\mu$ L de plasma ont été mélangés à 360  $\mu$ L de méthanol ultrapure froid. Chaque échantillon a été vortexé durant 30 secondes avant d'être centrifugé 30 minutes à 10 000 g et 4°C. Une partie du surnageant (380  $\mu$ L) a été séchée par un système d'évaporation sous vide de type Speedvac®. Avant injection en UPLC, les résidus sont

repris dans 60  $\mu$ L de méthanol:eau (50:50, v:v) avant d'être de nouveau centrifugés selon les mêmes conditions. Enfin, 40  $\mu$ L de surnageant ont été mis en cupules pour analyse.

Plusieurs paramètres de validation ont été testés. Les limites de quantifications (LOQ) des deux molécules ont d'abord été déterminées en injectant 5 fois de petites concentrations ; la LOQ étant la plus petite concentration pour laquelle l'écart type relatif (*relative standard deviation*, RSD) des 5 réplicats était inférieur à 15%, et pour laquelle la déviation entre la concentration théorique et la concentration mesurée était inférieure à 15%.

Après avoir déterminé les LOQ, trois concentrations ont été utilisées pour le reste des mesures de validation de méthode. Les plus fortes concentrations ont été injectées et suivies directement d'un blanc (injection du solvant), afin de s'assurer du *carry-over*. Ces fortes concentrations ont également été injectées juste avant un plasma blanc, pour comparer les chromatogrammes et s'assurer de l'absence de pics co-éluant avec les composés d'intérêt. Enfin, l'effet matrice et l'efficacité de l'extraction ont été déterminées en ajoutant dans les échantillons les composés à trois concentrations connues, après extraction ou avant extraction, respectivement.

### 2.1.2 Résultats et discussion de la validation de méthode

Après détermination des LOQ (0,5 ng/mL et 25 ng/mL pour l' $\epsilon$ -viniférine et VG1, respectivement) les gammes d'étalonnage ont pu être établies. Les équations de droite d'étalonnage étant différentes, il semblerait que l'expression de la concentration des glucuronides en équivalence  $\epsilon$ -viniférine entraîne une sous-estimation des concentrations réelles de ces glucuronides.

La méthode d'extraction a été validée, comme décrit dans la publication page 138. Cependant, concernant VG1, un effet matrice a été observé. En effet, une perte de 30% du signal a été calculée entre VG1 ajouté dans le solvant et VG1 ajouté dans un plasma blanc préalablement extrait. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela ; VG1 a pu interagir avec les protéines plasmatiques comme l'albumine ou les lipoprotéines [265], et ainsi précipiter lors de la dernière centrifugation du protocole, ou subir des phénomènes de suppression d'ionisation due à des interactions matricielles lors de l'analyse au spectromètre de masse. Afin de s'affranchir de ces biais, les gammes étalon ont été réalisées dans la matrice, c'est-à-dire dans le plasma ( $R^2$  supérieurs à 0,999) (Figure 35).

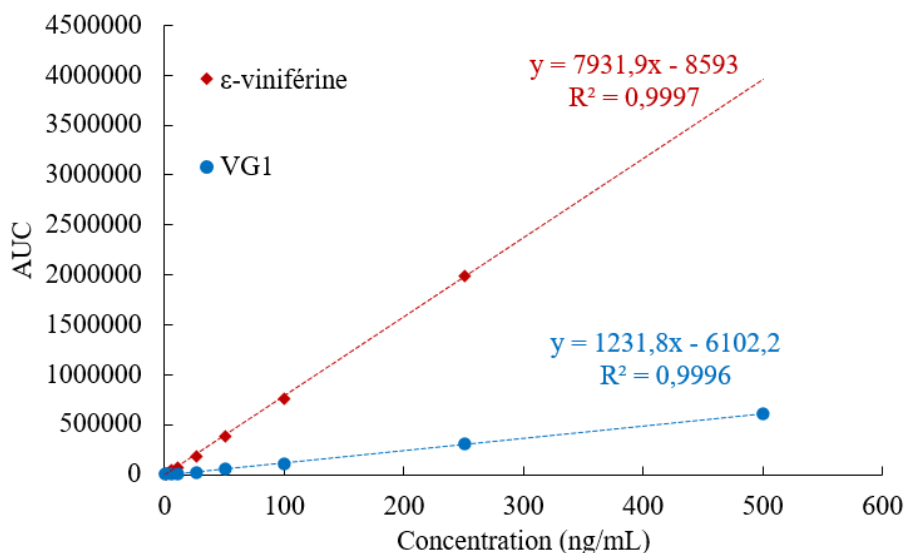


Figure 35. Courbes de calibration de l' $\epsilon$ -viniférine et VG1 dans le plasma blanc de rat

Ce travail de validation nous permettra donc de doser avec certitude l' $\epsilon$ -viniférine et ses glucuronides dans le plasma de rats de l'expérimentation *in vivo* décrite dans le paragraphe suivant.

## 2.2 Impact de l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine sur ses paramètres pharmacocinétiques

L'expérience *in vivo* sur rat a été réalisée après approbation par le comité d'éthique de l'Université de Bordeaux.

Cette expérience a été réalisée sur rats Wistar divisés en deux groupes. Le premier groupe a reçu l' $\epsilon$ -viniférine sous sa forme libre à hauteur de 20 mg/kg pc et le second a reçu l' $\epsilon$ -viniférine encapsulée dans les MLLs, à 20 mg/kg pc d' $\epsilon$ -viniférine également. Les deux groupes ont reçu la molécule par voie orale (administration intra-gastrique). Les plasmas ont ensuite été récupérés à différents temps (20, 40, 60, 100, 140, 180 et 210 minutes après administration). Quatre heures après administration, les rats ont été sacrifiés et les foies, les reins, et quatre tissus adipeux blancs (épididymaire, mésentérique, rétro-péritonéal et sous-cutané) ont été prélevés.

L'analyse de ces échantillons a fait l'objet d'une publication scientifique en révision dans le journal *Nutrients*, dans l'issue spéciale « Natural Food Ingredients for Human Health : New Insights from a Metabolic Perspective ».

Cet article a pour titre « *Trans- $\epsilon$ -viniferin encapsulation in multi-lamellar liposomes: consequences on pharmacological parameters, biodistribution and glucuronide formation in rats* ».

Article

# Trans- $\epsilon$ -viniferin encapsulation in multi-lamellar liposomes: consequences on pharmacological parameters, biodistribution and glucuronide formation in rats

Pauline Beaumont<sup>1,2</sup>, Chrystel Faure<sup>3,4</sup>, Arnaud Courtois<sup>1,2,5</sup>, Michael Jourdes<sup>1,2</sup>, Axel Marchal<sup>1,2</sup>, Pierre-Louis Teissedre<sup>1,2</sup>, Tristan Richard<sup>1,2</sup>, Claude Atgié<sup>3,4\*</sup> and Stéphanie Krisa<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> UR Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon, France ;

<sup>2</sup> Bordeaux INP, UR Œnologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Université de Bordeaux, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

<sup>4</sup> Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

<sup>5</sup> Centre Antipoison et de Toxicovigilance de Nouvelle Aquitaine, Bâtiment UNDR, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

\* Correspondence: stephanie.krisa@u-bordeaux.fr; Tel.: +33-(0)5-57-57-59-53 and claudie.atgie@bordeaux-inp.fr; Tel: +33-(0)5-40-00-68-37

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Nutrients* **2021**, *13*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Trans- $\epsilon$ -viniferin* ( $\epsilon$ Vin) is a resveratrol dimer exhibiting promising biological activities for human health. Its bioavailability being low, the development of encapsulation methods would be used to overcome this issue. The aim of this study was to measure the consequences of the encapsulation of  $\epsilon$ Vin in multilamellar liposomes on its pharmacokinetic parameters, metabolism and tissue distribution in rats. After oral administration of  $\epsilon$ Vin (20 mg/kg body weight), either as free or encapsulated forms, plasmas were sequentially collected (from 0 to 4 h) as well as liver, kidneys and adipose tissues (4 h after administration) and analyzed by LC-HRMS. The glucuronide metabolites ( $\epsilon$ VG) were also produced by hemisynthesis for their quantification in plasma and tissues. The encapsulation process did not significantly modify the pharmacokinetic parameters of  $\epsilon$ Vin itself. However, a significant increase of the  $T_{1/2}$  was noticed for  $\epsilon$ VG after administration of the encapsulated form as compared to the free form. An accumulation of  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG in adipose tissues was noticed, and interestingly a significant increase of the latter in the mesenteric one after administration of the encapsulated form was highlighted. Since adipose tissues could represent storage depots, and encapsulation allows to prolong the exposure time of glucuronide metabolites in the organism, this could be of interest to promote their potential biological activities.

**Keywords:** *Trans- $\epsilon$ -viniferin*; resveratrol dimer; pharmacokinetic; liposome encapsulation; bio-distribution

## 1. Introduction

*Trans- $\epsilon$ -viniferin* ( $\epsilon$ Vin) is a resveratrol dehydrodimer belonging to the stilbene's family. Stilbenes are phytoalexins present in several edible plant families [1]. The main source of these compounds in European food is grapes [2] and their derivative products such as grapes juice or wine, but also peanuts and red fruits [3,4]. The average daily consumption of stilbenes differs according to several criteria; but is estimated at 0.5 mg/person/day according to a Spanish study, and 0.3 mg/person/day according to a Chinese one [3,5,6].

Although resveratrol is the most widely studied stilbene for its biological activities, recent researches focus on the biological properties of others stilbenes. Indeed, numerous studies on the biological properties of  $\epsilon$ Vin, a dimer present in red wines [7] in the wood



of *Vitis vinifera* (up to 7.7 g/kg dry weight, more abundant than resveratrol [8]), have shown that this molecule could have some benefits for human health.

$\epsilon$ Vin has indeed shown antioxidant activities, by inhibiting the radical ABTS<sup>•+</sup> [9,10] and also by inhibiting peroxidation of  $\beta$ -carotene, or by limiting oxidation of DMSO/O<sub>2</sub>-system [11].  $\epsilon$ Vin also reduced nitric oxide production by microglia and macrophages (BV-2 cells and RAW 264.7 cells) activated by lipopolysaccharide, suggesting some anti-inflammatory properties [12,13]. Moreover, studies have shown interesting  $\epsilon$ Vin neuroprotective activities, by inhibiting A $\beta$  aggregation involved in Alzheimer's disease [14,15], or by activating sirtuin 3 and protecting mitochondrial functions in huntingtin mutant cell line [16]. Experiments on cancer cell lines like those derived from hepatocytes, fibroblasts, and leukemia cells or lymphoids revealed antiproliferative activities of  $\epsilon$ Vin [17–22], even if other studies suggested no or very low activity [23,24]. Other research groups have shown more efficient *in vitro* anti-hepatitis C virus [25], antidepressant [26], and cardio-protective activities by decreasing the systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats by comparing to its monomer resveratrol [27,28]. Moreover,  $\epsilon$ Vin is also promising for its anti-adipogenic properties insofar as it has been shown that this compound decreased lipid accumulation and adipogenesis marker gene expression such as Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in 3T3-L1 adipocytes cell line [29]. The decrease in body weight gain in rat fed with a high fat diet and the reduction of the mass of white adipose tissues in mice after oral administration of  $\epsilon$ Vin [29,30] highlight its potential *in vivo* biological activities. These interesting properties lead to ask the question of its fate in the systemic circulation after ingestion.

Nowadays and to our knowledge, the only study about  $\epsilon$ Vin pharmacokinetic characterization and bioavailability after oral administration was published by Kim *et al.* [31]. They showed a  $\epsilon$ Vin maximal concentration ( $C_{\max}$ ) of 42 ng/mL for a maximal time ( $T_{\max}$ , time to reach the  $C_{\max}$ ) between 15 and 30 minutes after oral administration of 40 mg/kg body weight (bw) in mice, and calculated a bioavailability of 0.77% [31]. This very poor bioavailability could be explained by a low absorption through the intestinal barrier [32] and/or a strong intestinal and/or liver metabolism. It is now well documented that stilbenes are indeed subjected to biotransformations such as sulfation and glucuronidation, *via* sulfotransferase and UDP-glucuronosyltransferase, respectively. These detoxification processes take place mainly in the liver but also to a significant level in the enterocytes of the small intestine. These enzymatic transformations result in an increase of the compound hydrophilicity for an easier elimination into bile and urine. Two recent studies from our laboratory clearly confirmed a high metabolism of  $\epsilon$ Vin *in vitro* (S9 liver extract) and *in vivo* (in rats). In this last *in vivo* study, the pharmacokinetic parameters calculated, after intraperitoneal injection in rats, indicated a  $C_{\max}$  at 3.09, 5.16 and 0.2  $\mu$ g/mL for  $\epsilon$ Vin, its glucuronide ( $\epsilon$ VG) and its sulfate ( $\epsilon$ VS) metabolites, respectively, for an equivalent  $T_{\max}$  at 1 hour [33]. However, it is noteworthy that in these previous studies, the concentrations of these metabolites were expressed as the equivalent of the native form, as  $\epsilon$ VG and  $\epsilon$ VS are not commercially available. Metabolism was also observed for an isomer of  $\epsilon$ Vin,  $\delta$ -viniferin, after an oral administration at 70 mg/kg bw in rats. Indeed, Mao *et al.* quantified the glucuronides of  $\delta$ -viniferin, after hydrolysis with glucuronidase, and measured a concentration of glucuronide metabolites up to 7-fold higher than the native form [34]. At last, the quantification of  $\epsilon$ Vin and its metabolites in adipose tissue after intraperitoneal administration showed an accumulation of the molecule mainly in its native form, suggesting a storage role for this tissue [33].

Due to the very poor bioavailability of stilbenes, developing innovative formulations like micro-encapsulation could be a solution to improve their bioavailability [35]. Several methods have been proposed to increase the stability, solubility and bioavailability of polyphenols [36–38] such as single and double emulsions, co-crystallization, encapsulation in yeasts and liposomes. Some studies on polyphenols encapsulation (such as resveratrol, curcumin and quercetin) have shown a real efficiency in improving their pharmacokinetic parameters and their bioavailability [39], by increasing  $C_{\max}$  or  $T_{1/2}$  [40–43].

Liposomes are good candidates for *in vivo* applications because of their biocompatibility and low toxicity. The lipid bilayers that constitute liposomes allow to protect polyphenols against UV irradiation and *cis-trans* isomerization [44,45], increase their stability and preserve their anti-oxidant properties [46]. Among the different types of liposome encapsulation, multi-lamellar liposomes (MLLs) are advantageous for the encapsulation of polyphenols, because of the presence of several bilayers in which lipophilic molecules, such as  $\epsilon$ Vin, are inserted [47], leading to a higher encapsulation rate. Onion-type MLLs, also called spherulites<sup>®</sup>, are made up of lipid bilayers up to the core of vesicles, contrary to classical MLLs that display a limited number of bilayers and a large water core. Recently, we produced  $\epsilon$ Vin-loaded onions displaying a high encapsulation rate [48], considerably increasing its water solubility, and showing a decreased cytotoxicity of encapsulated  $\epsilon$ Vin on Caco-2 cell line [45].

This study aimed to investigate the consequences of  $\epsilon$ Vin encapsulation in onion-type MLLs on its pharmacokinetic parameters and tissular distribution after oral administration in rats. Plasma and tissue concentrations of the native form ( $\epsilon$ Vin) will be assessed, as well as those of glucuronides, through hemisynthetic production of these metabolites [33].

## 2. Materials and Methods

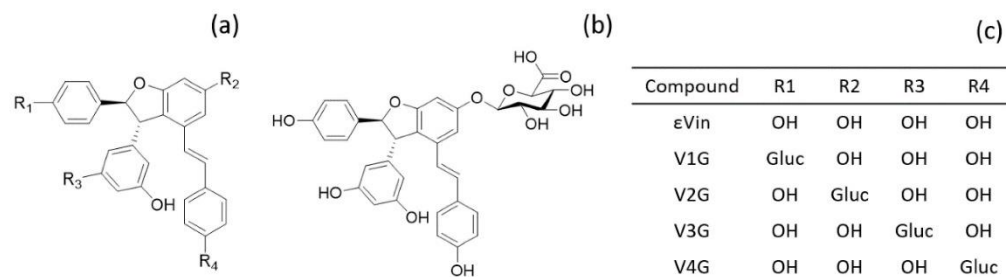
### 2.1. Chemical and stock solutions

#### 2.1.1. Chemical and reagents

$\epsilon$ Vin was produced as previously described [49], by extraction from grape shoot powder batch, and purity was confirmed by <sup>1</sup>H NMR (>89%). P75 (soya bean lecithin with 68-74% phosphatidylcholine and 7-11% phosphatidylethanolamine) was purchased from Lipoid GmbH (Germany). Tween 80, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetobromo-glucuronic acid methyl-ester, pyridine chlorosulfonic acid and propylene glycol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Methanol, ethanol and acetonitrile (LC-MS)-grade, trifluoroacetic acid (TFA) and formic acid were purchased from Fisher Scientific, and ultra-pure water was produced using Purelab Ultra System (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).

#### 2.1.2. Metabolites production

The four glucuronides (Figure 1) were obtained by hemisynthesis as previously described [50] with some modifications. One molar equivalent  $\epsilon$ Vin was dissolved in ethanol and then mixed with 20 molar equivalents of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Six molar equivalents of acetobromo-glucuronic acid methyl-ester dissolved in ethanol were added and the reaction mixture was stirred at 50°C for 24 hours under agitation. The reaction was then stopped by lowering the pH below 5 with 1% formic acid. Solvents were evaporated with vacuum rotatory evaporator before redissolving sample in methanol:water (50:50, v:v). The mixture was injected into semi-preparative high-performance liquid chromatography equipped with a binary pump and UV-VIS detector used at 320 nm (Prostar 325, Varian, Palo Alto, CA, USA). Solvent A and B were ultra-pure water and acetonitrile:water (50:50, v:v) respectively, both acidified with 0.025% of TFA. The gradient, used with a 2 mL/min flow rate was as follow: 0 min, 38% B; 0-55 min, 38-48% B; 55-57 min, 48-100% B; 57-60 min, 100% B; 60-62 min, 100-38 %B; 62-64 min; 38% B. Metabolites were individually collected and then injected in UPLC-DAD-MS to ensure their purity before being freeze-dried. For method validation and calibration curve, V2G (Figure 1) was used as it is the most predominant isomer found in rat [33].



**Figure 1.** Structure of the 4 isomers of  $\epsilon$ Vin. (a) Basic structure (b) structure of V2G (c) location of glucuronide group (gluc) depending on the isomer.

### 2.1.3. Stock solutions and calibration curves

$\epsilon$ Vin and V2G were precisely weighed and dissolved in ultra-pure (HPLC)-grade methanol to obtain a 1 mg/mL concentration. Stock solutions were aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. For calibration curves, dilutions were applied to give the following concentrations in methanol:water (50:50, v:v): 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 and 250 ng/mL and 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 ng/mL for  $\epsilon$ Vin and V2G, respectively

## 2.2. $\epsilon$ . Vin-loaded MLLs

### 2.2.1. Preparation of onions-type MLLs

MLLs were produced as previously described [33,48]. Briefly, P75, Tween 80 and  $\epsilon$ Vin (52.5 wt%, 11.5 wt% and 4 wt% of the final composition, respectively) were first individually solubilized in ethanol before being mixed together. The organic solvent was then removed by evaporation under  $\text{N}_2$  flux (0.1 bar). The mixture was freeze-dried (48 hours), and precisely weighed. The first half of ultra-pure water required (16 wt%) was added. Shearing using a microspatula was performed (1 min) before adding the other half of water (16 wt%) and starting three cycles of shear stress. One shear stress cycle consisted of 5 minutes of shearing with the spatula and 5 minutes of centrifugation (2000 rpm). The resulting viscous phase, made of MLLs in close contact, was kept at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 hours, and three additional shear stress cycles were then operated.

*In vivo* experiments on rats were performed using encapsulated  $\epsilon$ Vin. To remove un-encapsulated  $\epsilon$ Vin, MLLs were suspended in ultra-pure water (20 mg/mL, 40 mL per tube). An initial centrifugation (10 min, 500 rpm) allowed the precipitation of potential  $\epsilon$ Vin aggregates. The supernatants were then ultra-centrifuged for three hours at 100 000 g and  $8^{\circ}\text{C}$  (fast acceleration, slow deceleration), and supernatants were removed to keep only  $\epsilon$ Vin encapsulated in MLLs.

### 2.2.2. Characterization

The multi-lamellar character of the liposomes was confirmed by polarized light microscopy (Olympus BX51, x60 and x100 magnifications). The encapsulation rate of  $\epsilon$ Vin in MLLs was determined using UV-Vis spectrophotometry and using adsorption filtration method as previously developed [48]. The liposomes distribution size was established using dynamic light scattering (DLS, Vasco particle size analyzer, Cordouan Technologies Ltd, Pessac, France) with a refractive index of 1.33 and 1.45 for water and liposomes, respectively. The measurement was done in triplicate and results were analyzed using the Cumulant method. Finally, the zeta potential was determined using ZetaSizer Nano Series (Malvern).

### 2.3. Pharmacokinetic studies

#### 2.3.1. Animals and treatments

Experiments were conducted in accordance with Directive 2010/63/EU [51] and approved by the Bordeaux University Institutional Ethics Committee for Animal Research (IEC-AR CEEA 50, MESR approval A18380). Male Wistar rats (Janvier-LABS, Saint Berthevin, France) were maintained in controlled conditions: 12 h light/12 h dark cycle, humidity 50-60% and an ambient temperature of  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  (animal facility agreement number: B33-063-917). Free access to food and water was allowed up to 16 hours before experiments started. Rats were randomly divided into two groups. Group A ( $n=5$ , average weight =  $307.8 \pm 7.7$  g) received  $\epsilon\text{Vin}$  dissolved in propylene glycol (5.25 mg/mL), while group B ( $n=6$ , average weight =  $308 \pm 10.7$  g) received the same dose of  $\epsilon\text{Vin}$  but encapsulated in MLLs and suspended in ultra-pure water. Both solutions were administered by oral gavage and precisely measured to reach a dose of 20 mg/kg bw of  $\epsilon\text{Vin}$ . Blood was collected through the tail vein, making a slanting incision during the first collect. Rats were slightly anesthetized by isoflurane before every blood sample collection (600  $\mu\text{L}$ ) at the following time points: 20, 40, 60, 100, 140, 180, and 210 minutes after gavage. They were sacrificed at 240 min by a high dose of isoflurane and rapid exsanguination with saline solution injected in the right ventricular cardiac cavity with peristaltic pump (10 mL/min). All blood samples were collected in heparinized tubes and centrifuged (10 000 g, 10 min) before sampling plasma. The liver, kidneys and four white adipose tissues (epididymal, retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous) were removed, weighed and immediately immersed in liquid nitrogen. All blood and tissues samples were kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

#### 2.3.2. Extraction of $\epsilon\text{Vin}$ and metabolites from plasma and tissues

Extractions were performed as previously described [33] with some modifications to improve quantification. For plasma extraction, 360  $\mu\text{L}$  of methanol ( $4^\circ\text{C}$ ) were added to an aliquot of 120  $\mu\text{L}$  of plasma. The sample was vortexed during three minutes before centrifugation (30 min, 12 000 g,  $4^\circ\text{C}$ ). The supernatant (380  $\mu\text{L}$ ) was removed and evaporated using a SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Residue was kept in  $-80^\circ\text{C}$  before analysis. For tissues extraction, tissues (about 0.5 g) were first cut with scalpels before being mixed with 4 mL of methanol:water (80:20, v:v). Samples were homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer (IKA, Staufen, Deutschland) before being intensely vortexed. Then, samples were centrifuged 20 minutes at 10 000 g and  $4^\circ\text{C}$  before sampling 3 mL of supernatant. All supernatants were evaporated using a SpeedVac concentrator and kept at  $-80^\circ\text{C}$ . Residues were reconstituted in 60  $\mu\text{L}$  and 250  $\mu\text{L}$  of methanol:water (50:50, v:v) or plasma and tissue, respectively. They were vortexed intensely and centrifuged at 12 000 g during 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$  before being injected the supernatant in LC-HRMS.

### 2.4. LC-HRMS Quantification

The quantification of  $\epsilon\text{Vin}$  and the total of glucuronides ( $\epsilon\text{VG}$ ) in plasma and tissues was performed as previously described [33] with some modifications concerning the mass parameters. The U-HPLC separation was carried out with a Vanquish Flex system (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) consisting in a binary pump, an autosampler and a heated column compartment. The liquid chromatography separation was performed as previously detailed using C18 column (BEH C18 2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  particle size, Waters, Guyancourt, France). The flow rate was set as 450  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The injection volume was 5  $\mu\text{L}$  and the eluents were 0.1% formic acid in water for A and 0.1% formic acid in acetonitrile for B. The eluent B varied as follows: 0 min, 25%; 0.5 min, 25%; 3.6 min, 50%; 3.9 min, 50%; 4 min, 100%; 5.7 min, 100%; 5.8 min, 25%; 7 min, 25%. The column and sample temperature were  $30^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$ , respectively. The Exactive benchtop Orbitrap mass spectrometer equipped with a HESI probe (both from Thermo

Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used. The source parameters were optimized as follows: sheath gas flow rate 65 arbitrary units (a.u.); auxiliary gas flow rate 15 a.u.; sweep gas flow rate 3 a.u.; spray voltage -3.5 kV; capillary temperature 350 °C; capillary voltage -60 V; tube lens voltage -135 V; skimmer voltage -26 V and HESI probe temperature 320 °C. Full MS scan data were acquired in negative ion mode within the range of  $m/z$  100-1800 at a resolution of 25,000 FWHM. The automatic gain control target was set at  $1e6$  ions, with a maximum injection time of 100 ms. Data were generated from XCalibur (version 2.1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) with Qualbrowser and Quanbrowser, and area under curves (AUC) were determined by integrating peaks obtained in extracted ion chromatograms built in a 5-ppm window around the theoretical mass of the deprotonated ions [M-H]<sup>-</sup> (at  $m/z$  453.1343 u and  $m/z$  629.1664 for  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG, respectively).

### 2.5. Method validation

The method validation was carried out in accordance with the United States Food and Drug Administration [52] and the European Medicines Agency Guidelines [53] as previously described in other pharmacokinetic studies [54–59].

#### 2.5.1. Calibration curves and limit of quantification (LOQ)

The LOQ of  $\epsilon$ Vin and V2G were determined by injecting 5 times each concentration and calculating the relative standard deviation (RSD). LOQs were defined as the lowest concentrations for which trueness (deviation from nominal value) and precision (RSD) were less than 15%. The calibration curve of each compound was determined by integrating peak areas from appropriated extracted ion chromatogram. Each calibration curve was done by spiking the analytes in extracted blank plasma. The correlation coefficient ( $R^2$ ) ensured good linearity ( $>0.9$ ).

#### 2.5.2. Selectivity, carry-over, intra-day precision and accuracy

Each sample was realized in triplicate. Blank plasmas spiked with  $\epsilon$ Vin or V2G at the highest concentrations were directly injected before blank solvent to perform carry-over test. To ensure a good selectivity, blank plasmas were also injected after solvent spiked with  $\epsilon$ Vin or V2G. For both tests, peaks at the same retention time of compounds were integrated. An area under curve (AUC) of non-spiked blank plasma and blank solvent inferior to 20% of LOQ ensured an acceptable selectivity and carry-over, respectively.

Intra-day test was performed by spiking low concentration (2.5 ng/mL for  $\epsilon$ Vin and 25 ng/mL for V2G, LC), medium concentration (25 ng/mL for  $\epsilon$ Vin and 250 ng/mL for V2G, MC) and high concentration (250 ng/mL for  $\epsilon$ Vin and 2500 ng/mL for V2G, HC) in solvent (methanol:water, 50:50, v:v) and in five replicates. RSD (%) and relative error (RE, %) from the nominal value were calculated to determine precision and accuracy, respectively.

#### 2.5.3. Matrix effect (ME) and extraction recovery (ER)

LC, MC and HC were spiked in extracted blank plasma in five replicates. Each concentration was also prepared in solvent (methanol:water, 50:50, v:v) in five replicates. After integrating each peak in the extracted ion chromatogram, ME was calculated as follows:

$$ME = \frac{\text{AUC analyte spiked in blank plasma after extraction}}{\text{AUC analyte in solvent}} * 100$$

For ER, blank plasmas were spiked with 4  $\mu$ L of three concentrations prepared in ultra-pure water before operating the extraction protocol. Concentrations were calculated in order to obtain final concentration of LC, MC and HC after extractions, each in five replicates. Fifteen others samples were prepared spiking with the same concentrations in solvent (three concentrations, 5 replicates). After integrating each peak in the extracted ion chromatogram, ER was calculated as follows:

$$ER = \frac{\text{AUC analyte spiked in blank plasma before extraction}}{\text{AUC analyte in solvent}} * 100$$

2.6. Data analysis

Mean concentration-time profiles of εVin and εVG in the rats at scheduled sampling times were analyzed with the non-compartmental pharmacokinetic method using PKSolver (an Excel add-on), and maximum concentration (C<sub>max</sub>) and time to reach C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>) were recorded directly. Significant differences of εVin and εVG concentrations in tissues and plasmas were determined using Student test.

3. Results

3.1ε. Vin-loaded MLLs characterization

The encapsulation of εVin was carried out by following the optimized protocol developed previously [48]. The multi-lamellar character was checked by polarized light microscopy. Indeed, the organized structure of MLLs induces birefringence that produces Maltese crosses, as previously observed [48]. Their average size was 247 ± 8 nm as measured by DLS, while their Zeta potential was -47.0 ± 0.4 mV, in accordance with previous results [45,48]. The encapsulation efficiency was 75 ± 5%. After separating the free εVin from the encapsulated one by ultra-centrifugation (see section 2.2.1), the pellets were analyzed in UPLC-MS to administer a precise quantity of εVin to the animals.

3.2. Validation of extraction and LC-HRMS quantitation method

The extraction and the analytical method for the quantification of εVin and V2G in plasma were validated using five replicates in terms of sensitivity, selectivity, carry-over, intraday precision, accuracy, matrix effect and extraction recovery.

The correlation coefficient of the calibration curves (R<sup>2</sup>= 0.999 for εVin and V2G) ensured a good linearity. LOQ was determined at 0.5 ng/mL for εVin and 25 ng/mL for V2G. No significant peak was measured at the retention times of the compounds, which ensured acceptable selectivity (data not shown). Blank plasmas injected after plasmas spiked with HC did not contain εVin or its glucuronide forms, which validated the carry-over test (data not shown). For the intraday precision and accuracy tests, RSD (%) and RE (%) were calculated respectively, from blank plasmas spiked with LC, MC or HC (n=5). For the three tested concentrations, both precision and accuracy were less than 15% for εVin and only RE was higher than 15 % for V2G in low concentration (Table 1).

Table 1. Intraday precision of εVin and V2G in rat plasma (n=5).

	Level	Spiked concentration (ng/mL)	Mean concentration (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
εVin	LC	2.5	2.5 ± 0.2	9.1	0.8
	MC	25	23.4 ± 0.4	1.6	-6.4
	HC	250	249.6 ± 4.6	1.8	-0.2
V2G	LC	25	33.9 ± 0.7	2.1	35.6
	MC	250	236.1 ± 3.3	1.4	-5.5
	HC	2500	2504.9 ± 45.1	1.8	0.2

Results for matrix effect and extraction recovery are shown in Table 2. For εVin, the matrix effect was considered negligible. On the other hand, we can note a slight decrease in peak intensity for the extraction recovery measurement. For V2G, there was no impact of the extraction process on metabolite signal, but a significant matrix effect with a signal loss of about 30%. The establishment of the standard curves directly in the matrix allows us to free ourselves from this ME.

Table 2. Matrix effect and extraction recovery of εVin and V2G in rat plasma.

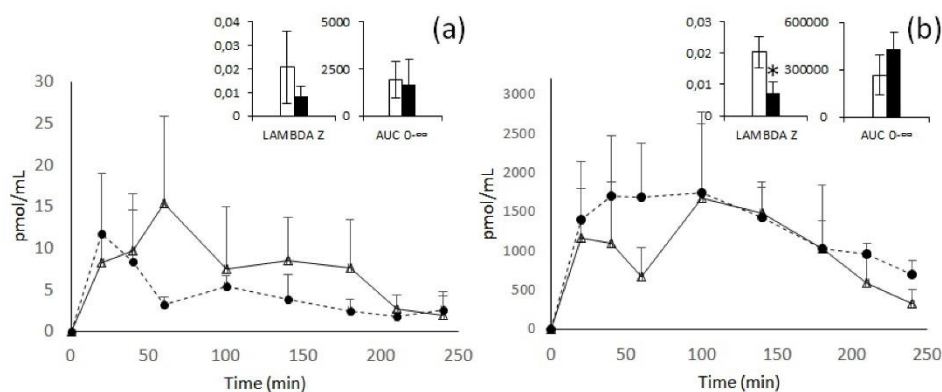
	Level	Spiked concentration (ng/mL)	Matrix effect		Extraction recovery	
			Mean ± SD (%)	RSD (%)	Mean ± SD (%)	RSD (%)
εVin	LC	2.5	93.3 ± 7.2	7.8	87.2 ± 30.1	34.5
	MC	25	115.1 ± 2.3	2.0	87.2 ± 3.8	4.4
	HC	250	103.7 ± 4.4	4.2	74.7 ± 1.4	7.8
V2G	LC	25	70.5 ± 15.2	21.5	114.7 ± 14.4	12.6
	MC	250	69.2 ± 4.5	6.5	96.2 ± 7.8	8.1
	HC	2500	69.5 ± 4.2	6.1	96.8 ± 4.2	4.3

3.3. Pharmacokinetic study

The evolution of the plasma concentrations over time of εVin (expressed in pmol/mL of εVin) and the total glucuronide metabolites (expressed in pmol/mL of V2G, the main metabolite) are shown in Figure 2. The main pharmacokinetic parameters are detailed in the inserts of figure 2 and in table 3. After oral administration of the free form of εVin 20 mg/kg bw, the plasma concentration of the untransformed form reached its maximum concentration after one hour (C<sub>max</sub> = 15 ± 11 pmol/mL). The total glucuronides reached their C<sub>max</sub> after 100 min and have a concentration 108 times higher than the aglycone form. For these glucuronides, two peaks of concentration are clearly visible at 20 and 100 minutes (Figure 2, b).

**Table 3.** Pharmacokinetic parameters of εVin and εVG in rat plasma after oral administration of free or encapsulated form. T<sub>max</sub>, T<sub>1/2</sub> and mean residence time (MRT) were expressed in minutes, C<sub>max</sub> in pmol/mL, AUC in pmol/mL/min and Lambda z in min<sup>-1</sup>. Comparisons between encapsulated or free form administration were analyzed by Student’s t-test (\*p < 0.05).

	εVin		εVG	
	Free	Encapsulated	Free	Encapsulated
T <sub>max</sub>	60	20	100	100
C <sub>max</sub>	15.3 ± 10.5	11.7 ± 7.3	1667.4 ± 1103.3	1746.3 ± 875.6
T <sub>1/2</sub>	55.0 ± 33.9	114.8 ± 80.4	38.2 ± 11.2	118.8 ± 65.1 *
AUC <sub>0-t</sub>	1689.1 ± 682.0	1009.8 ± 328.3	245827.3 ± 114219.8	307086.4 ± 316383.9
AUC <sub>0-∞</sub>	1919.7 ± 955.2	1660.1 ± 1313.1	264191.0 ± 123786.4	432315.4 ± 106406.4
MRT	126.9 ± 27.9	196.4 ± 130.4	123.7 ± 12.0	213.2774 ± 93.9
Lambda z	0.0207 ± 0.0153	0.0082 ± 0.0043	0.0198 ± 0.0056	0.0074 ± 0.0036 *



**Figure 2.** Kinetic profiles of εVin (a) and εVG (b) after oral administration of 20 mg/kg bw of free (white triangles) or encapsulated (black circles) εVin. Data are expressed in pmol/mL of plasma + standard deviation (SD). Lambda z and AUC<sub>0-∞</sub> are expressed in

min<sup>-1</sup> and pmol/mL/min, respectively. Comparisons between free (white) or encapsulated (black) forms administration were analyzed by Student test (\*p < 0.05).

Considering the encapsulation of  $\epsilon$ Vin in MLLs, despite apparent difference in the plasma kinetic profiles, no significant effect was observed in all the pharmacokinetic parameters followed for the original form ( $\epsilon$ Vin). However, after administration of the encapsulated form of  $\epsilon$ Vin, glucuronides are also the predominant form present in plasma. Moreover, encapsulation of  $\epsilon$ Vin modifies the kinetics of  $\epsilon$ VG. Indeed, a plateau is observed from 20 min to 100 min, instead of the 2 peaks obtained with free  $\epsilon$ Vin. Moreover, the time required for the elimination of 50% ( $T_{1/2}$ ) of the glucuronide metabolites is significantly increased, nearly 3 times (from  $38 \pm 11$  min to  $119 \pm 65$ , p < 0,05) by the encapsulation procedure, in accordance with a significant decrease of the late elimination constant ( $\lambda_z$ ) in the same range of magnitude (from  $0.0198 \pm 0.0056$  min<sup>-1</sup> to  $0.0074 \pm 0.0036$  min<sup>-1</sup>, p < 0,05) and a tendency to increase in  $AUC_{0-\infty}$  (Table 3, Figure 2, b insert).

#### 3.4. Quantification in tissue

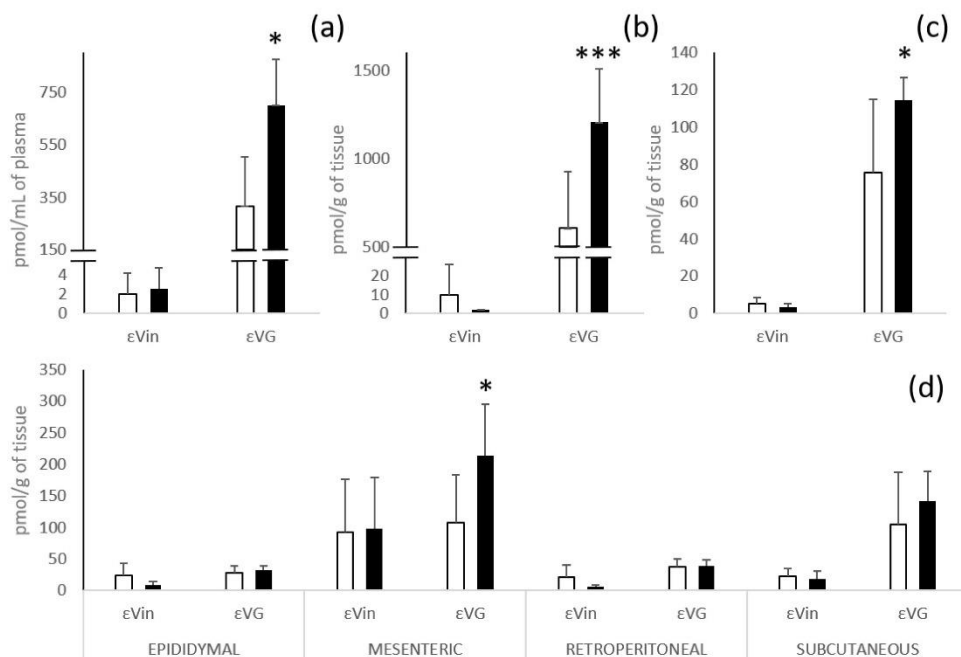
The  $\epsilon$ Vin biodistribution displays great differences in terms of concentration but also of native / glucuronide form ratio according to the tissues (Figure 3).

After administration of the free form of  $\epsilon$ Vin, total glucuronides are the majority forms in plasma, liver, and kidneys. In liver and kidneys,  $\epsilon$ Vin does not exceed a concentration of 10 pmol/g while  $\epsilon$ VG reached  $604 \pm 320$  and  $76 \pm 39$  pmol/g of tissue, respectively (60 times and 14 times the concentration of the native molecule) (Figure 3, b, c). These marked higher contents of  $\epsilon$ VG in plasma, liver and kidneys are not observed in adipose tissues, (Figure 3, d). The highest concentration of the native form was found in mesenteric adipose tissue ( $92 \pm 84$  pmol/g of tissue *versus* concentrations around 20 pmol/g of tissue for the three other depots). For the glucuronides form, only subcutaneous adipose tissue had a much higher  $\epsilon$ VG concentration than  $\epsilon$ Vin ( $105 \pm 83$  versus  $23 \pm 12$  pmol/g of tissue). Four hours after administration, the concentrations of  $\epsilon$ Vin in all the adipose tissues are always largely higher (5 to 10 times) than those measured in the other tissues (liver and kidneys) and plasmas.

The administration of the same amount of  $\epsilon$ Vin, in an encapsulated form, significantly increased (nearly double) the concentration of  $\epsilon$ VG in plasma ( $317 \pm 186$  to  $700 \pm 175$  pmol/mL), liver ( $604 \pm 320$  to  $1206 \pm 304$  pmol/g of tissue), kidneys ( $76 \pm 39$  to  $114 \pm 12$  pmol/g of tissue) and also in the mesenteric adipose tissue ( $108 \pm 75$  pmol/g to  $213 \pm 81$  pmol/g of tissue) (Figure 3). This effect was not observed for the native form.

Independently of the administration form of  $\epsilon$ Vin, it was observed that the level of  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG were markedly higher (2 to 3 times) in mesenteric adipose tissue than in the three others adipose tissues, excepted for the level of  $\epsilon$ VG in the subcutaneous depot. Finally, it looked like encapsulation led to a slight decrease in the concentration of native form after administration of MLLs in epididymal and retroperitoneal tissues.





**Figure 3.** Quantification of  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG in plasma (a), liver (b), kidneys (c) and different white adipose tissues (d) 4 hours after oral administration of 20 mg/kg bw of  $\epsilon$ Vin in free (white bars) or encapsulated (black bars) forms. Bars represent concentrations expressed at pmol/mL for plasma and pmol/g of tissue for tissue + SD. Comparisons between encapsulated or free form administration were analyzed by Student's t-test (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ).

#### 4. Discussion

This study was carried out with the aim to specifically quantify a resveratrol dimer,  $\epsilon$ -viniferin and its main metabolites, namely the mono-glucuronide forms, in biological samples after oral administration of this stilbene with or without an encapsulation procedure.

*Trans- $\epsilon$ -viniferin-glucuronide* production allowed its specific quantification in rat plasmas and tissues. In this study, we used one isomer of glucuronide where the glucuronide moiety is linked to the thirteenth carbon of the molecule (V2G, Figure 1). V2G, which is the major isomer found *in vitro* after incubation with hepatic fractions [50] and *in vivo* after intraperitoneal injection of  $\epsilon$ Vin in rat [33], is also the main glucuronides isomers formed of this study for both administration forms. Indeed, after oral administration, V2G is largely in majority followed by V3G, and some traces of V1G and V4G (data not shown). Sulfated metabolites, in low amounts in the *in vivo* study after intraperitoneal administration [33], were not found in this study.

In the only study on the bioavailability of  $\epsilon$ Vin in rodents, the authors measured its pharmacokinetic parameters, without measuring those of the metabolites. Authors used an oral administration of 40 mg/kg bw which is 2 times higher than the amount we used in our study (20 mg/kg bw). They obtained a  $C_{max}$  and an  $AUC_{0-\infty}$  2.8 and 3.6 times higher than our values, respectively. All these results confirm that  $\epsilon$ Vin is absorbed after oral administration and that its plasma concentration increases with the quantity administered [31]. The pharmacokinetic analysis of free  $\epsilon$ Vin in plasma revealed a strong glucuronidation of  $\epsilon$ Vin after oral administration of 20 mg/kg bw of the native form. Indeed, the maximal concentration of glucuronide forms is more than 100 times higher than the concentration of native form. After intraperitoneal administration of 50 mg/kg bw of  $\epsilon$ Vin, Courtois *et al.*, (2018) demonstrated that glucuronides were only 1.2 times more concentrated in plasma than the native form [33]. Although in the latter study,  $\epsilon$ VG was

expressed in  $\epsilon$ Vin equivalents, underestimating the glucuronide concentration by about 8-fold, it is shown here that  $\epsilon$ Vin undergoes much greater glucuronidation when administered orally than intraperitoneally. This could be explained by an intense intestinal metabolism of  $\epsilon$ Vin, as it has been already demonstrated for resveratrol [60,61]. Concerning these glucuronides, the two peaks on the kinetic of their plasma concentrations, at 20 and 100 minutes, could match with an enterohepatic recirculation of these metabolites. This enterohepatic cycle has already been demonstrated for glucuronic metabolites of other polyphenols, such as quercetin [62], but never for metabolites of stilbenes to our knowledge. However, different studies on stilbenes have shown that the second absorption peak of the native form occurs at different times depending on the molecule, the doses and the animal model used. This second absorption peak appeared around 60 minutes after oral administration of pterostilbene [63] and resveratrol [64,65] or more than 10 hours for the trimer,  $\alpha$ -viniferine [66], for example. Supplemental experiments such as bile analysis could confirm this hypothesis and determine in what form the molecule undergoes this enterohepatic circulation [67,68].

The impact of  $\epsilon$ Vin encapsulation in multilamellar liposomes on plasma  $\epsilon$ VG concentrations (appearance of a plateau) could be explained by a sustained release of  $\epsilon$ Vin from the MLLs in the lumen of the digestive tract. Indeed, the MLLs could be gradually degraded during the different digestion stages, thus increasing the duration of exposure of  $\epsilon$ Vin to the intestinal wall. Very few studies reported the use of encapsulated active compounds with MLLs for an oral administration *in vivo* in rats or other laboratory animals. However, Freund *et al.* (2001), reported that after oral administration, encapsulation of  $^{111}\text{In}$ -NTA (labeled amino-polycarboxylic acid) in spherulites led to a greater stability of the compound into the different gastrointestinal levels compared to the free form of the same compound [69]. Moreover, it was reported that MLLs' encapsulation of  $^{111}\text{In}$ -NTA significantly increases its plasma concentration in rat [70]. These authors suggested that the encapsulation process is able to increase the bioavailability of compound.

In addition, the Lambda-z, *i.e.*, the terminal elimination rate constant is significantly smaller for  $\epsilon$ VG when  $\epsilon$ Vin has been administered under its encapsulated form, which is correlated with the increase in the  $T_{1/2}$  of the compound in plasma. The significant variations of these two parameters, a trend of increase of the  $\text{AUC}_{0-\infty}$ , as well as the significant increase of  $\epsilon$ VG concentrations in plasma, liver and kidneys at 4 h suggest a slower elimination and thus a longer exposure time of  $\epsilon$ VG in the organism. The use of the encapsulated form could therefore result in a better and prolonged biological efficacy of the glucuronide compounds. Indeed, it is suggested today that glucuronide compounds have biological properties [71], for example, it has recently been shown that resveratrol and pterostilbene are able to reduce steatosis in cultured hepatocytes [72,73].

According to tissue analysis,  $\epsilon$ Vin was found in higher concentration in white adipose tissues than in plasma, liver and kidney 4 h after oral administration. This important presence of the native form in white adipose tissues had already been demonstrated after intraperitoneal administration [33]. However, this is the first time that it has been shown that although it is extensively metabolized, a stilbene is stored in relatively large quantities in its native form in white adipose tissues after oral administration. The native form being more lipophilic than the glucuronide ones, it might suggest that they are stored in the unilocular lipid droplets in adipocytes. Adipose tissues could thus act as a reservoir for  $\epsilon$ Vin after having captured the native circulating form, or after the cleavage of the glucuronide group of the metabolites. Unlike the intraperitoneal study, the glucuronide forms are also found in adipose tissues, testifying to the strong intestinal metabolism after oral administration.

Interestingly, the  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG contents were higher in the mesenteric depot than in the three other ones (except for  $\epsilon$ VG in the subcutaneous one) the encapsulation of  $\epsilon$ Vin significantly increasing the accumulation of the glucuronide metabolites in this adipose tissue. Mesenteric adipose tissue, dispersed throughout the small intestine, is highly vascularized with a great metabolic activity in the post-prandial state [74]. So, if these

anatomical and functional differences could logically explain the increased amount of  $\epsilon$ Vin and  $\epsilon$ VG, we also do not rule out possible plasma contamination of the tissues during their sampling. However, the hypothesis of proximity to the digestive system or of contamination with the plasma cannot justify the relative high concentrations found in the subcutaneous fatty tissues, again suggesting a storage role of adipose tissues.

## 5. Conclusions

Our study showed significant glucuronidation of  $\epsilon$ Vin which occurred mainly in the liver and probably also in the intestine after oral administration. The presence of  $\epsilon$ Vin and its glucuronide metabolites in adipose tissues was also demonstrated, which means that adipose tissues could represent a storage tissue, but also be a target tissue in which the dimer could regulate lipid metabolism.

This study also showed that, although encapsulation did not improve the plasma concentrations of  $\epsilon$ Vin, its main impact was to delay the elimination of its glucuronide metabolites, thus extending their presence in the organism. Therefore, now that the encapsulation protocol has been developed, it could be used to study the promising biological application of  $\epsilon$ Vin for human health.

**Author Contributions:** Conceptualization, AC PB SK CA CF MJ TR; methodology, PB, AC, MJ, AM, CF, TR, CA, SK; method validation, PB, AM; formal analysis, AC SK CA PB AM MJ; investigation, AC SK CA PB CF MJ.; data curation, PB AM; writing-original draft preparation, PB AC SK CA; writing—review and editing, PB, AC, MJ, AM, CF, TR, CA, SK; supervision, CA AC SK CF TR. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the Directive 2010/63/EU, and approved by the Bordeaux University Institutional Ethics Committee for Animal Research (IEC-AR CEEA 50, MESR approval A18380).

**Acknowledgments:** The authors thank the QIV axis from the Enology Research Unit (EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Université de Bordeaux), especially Marie Le Scanff.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lin, M.; Yao, C.S. Natural oligostilbenes. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, 2006; Vol. 33, pp. 601–644.
2. Pugajeva, I.; Perkons, I.; Górnas, P. Identification and Determination of Stilbenes by Q-TOF in Grape Skins, Seeds, Juice and Stems. *Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, *74*, 44–52, doi:10.1016/j.jfca.2018.09.007.
3. Khawand, T. el; Courtois, A.; Valls, J.; Richard, T.; Krisa, S. A Review of Dietary Stilbenes: Sources and Bioavailability. *Phytochemistry Reviews* **2018**, *17*, 1007–1029, doi:10.1007/S11101-018-9578-9.
4. Vitrac, X.; Bornet, A.; Vanderlinde, R.; Valls, J.; Richard, T.; Delaunay, J.C.; Mérillon, J.M.; Teissédre, P.L. Determination of Stilbenes ( $\delta$ -Viniferin, Trans-Astringin, Trans-Piceid, Cis- and Trans-Resveratrol,  $\epsilon$ -Viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5664–5669, doi:10.1021/jf050122g.
5. Zamora-Ros, R.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M.; Berenguer, T.; Jakszyn, P.; Martínez, C.; Sánchez, M.J.; Navarro, C.; Chirlaque, M.D.; Tormo, M.-J.; et al. Concentrations of Resveratrol and Derivatives in Foods and Estimation of Dietary Intake in a Spanish Population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain Cohort. *British Journal of Nutrition* **2008**, *100*, 188–196, doi:10.1017/S0007114507882997.
6. Li, G.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Lang, J.; Chen, Y.; Ling, W. Estimated Daily Flavonoid and Stilbene Intake from Fruits, Vegetables, and Nuts and Associations with Lipid Profiles in Chinese Adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **2013**, *113*, 786–794, doi:10.1016/j.jand.2013.01.018.

7. Benbouguerra, N.; Hornedo-Ortega, R.; Garcia, F.; el Khawand, T.; Saucier, C.; Richard, T. Stilbenes in Grape Berries and Wine and Their Potential Role as Anti-Obesity Agents: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *112*, 362–381, doi:10.1016/j.tifs.2021.03.060.
8. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Waffo-Teguo, P.; Valls, J.; Palos Pinto, A.; Richard, T.; Cluzet, S.; Mérillon, J.M. Wood and Roots of Major Grapevine Cultivars and Rootstocks: A Comparative Analysis of Stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30*, 320–331, doi:10.1002/pca.2815.
9. Sáez, V.; Pastene, E.; Vergara, C.; Mardones, C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gómez-Alonso, S.; Gómez, M.V.; Theoduloz, C.; Riquelme, S.; von Baer, D. Oligostilbenoids in *Vitis Vinifera* L. Pinot Noir Grape Cane Extract: Isolation, Characterization, in Vitro Antioxidant Capacity and Anti-Proliferative Effect on Cancer Cells. *Food Chemistry* **2018**, *265*, 101–110, doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.050.
10. Nopo-Olazabal, C.; Hubstenberger, J.; Nopo-Olazabal, L.; Medina-Bolivar, F. Antioxidant Activity of Selected Stilbenoids and Their Bioproduction in Hairy Root Cultures of Muscadine Grape (*Vitis Rotundifolia* Michx.). In Proceedings of the Journal of Agricultural and Food Chemistry; J Agric Food Chem, December 4 2013; Vol. 61, pp. 11744–11758.
11. Privat, C.; Telo, J.P.; Bernardes-Genisson, V.; Vieira, A.; Souchart, J.P.; Nepveu, F. Antioxidant Properties of Trans- $\epsilon$ -Viniferin as Compared to Stilbene Derivatives in Aqueous and Nonaqueous Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1213–1217, doi:10.1021/jf010676t.
12. Nassra, M.; Krisa, S.; Papastamoulis, Y.; Kapche, G.D.; Bisson, J.; André, C.; Konsman, J.P.; Schmitter, J.M.; Mérillon, J.M.; Waffo-Téguo, P. Inhibitory Activity of Plant Stilbenoids against Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Planta Medica* **2013**, *79*, 966–970, doi:10.1055/s-0032-1328651.
13. Aja-Perez, I.; Krisa, S.; Hornedo-Ortega, R.; Ruiz-Larrea, M.B.; Ruiz-Sanz, J.I.; Richard, T.; Courtois, A. Stilbenes at Low Micromolar Concentrations Mitigate the NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and ROS Production in LPS-Stimulated Murine Macrophages. <https://doi.org/10.1080/22311866.2021.1923571> **2021**, *11*, 212–222, doi:10.1080/22311866.2021.1923571.
14. Rivière, C.; Papastamoulis, Y.; Fortin, P.Y.; Delchier, N.; Andriamanarivo, S.; Waffo-Teguo, P.; Kapche, G.D.W.F.; Amira-Guebalia, H.; Delaunay, J.C.; Mérillon, J.M.; et al. New Stilbene Dimers against Amyloid Fibril Formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3441–3443, doi:10.1016/j.bmcl.2009.09.074.
15. Vion, E.; Page, G.; Bourdeaud, E.; Paccalin, M.; Guillard, J.; Rioux Bilan, A. Trans  $\epsilon$ -Viniferin Is an Amyloid- $\beta$  Disaggregating and Anti-Inflammatory Drug in a Mouse Primary Cellular Model of Alzheimer's Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2018**, *88*, 1–6, doi:10.1016/j.mcn.2017.12.003.
16. Fu, J.; Jin, J.; Cichewicz, R.H.; Hageman, S.A.; Ellis, T.K.; Xiang, L.; Peng, Q.; Jiang, M.; Arbez, N.; Hotaling, K.; et al. Trans-( $\epsilon$ )-Viniferin Increases Mitochondrial Sirtuin 3 (SIRT3), Activates AMP-Activated Protein Kinase (AMPK), and Protects Cells in Models of Huntington Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 24460–24472, doi:10.1074/jbc.M112.382226.
17. Billard, C.; Izard, J.C.; Roman, V.; Kern, C.; Mathiot, C.; Mentz, F.; Kolb, J.P. Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of Resveratrol,  $\epsilon$ -Viniferin and Vine-Shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes. *Leukemia and Lymphoma* **2002**, *43*, 1991–2002, doi:10.1080/1042819021000015952.
18. Colin, D.; Lancon, A.; Delmas, D.; Lizard, G.; Abrossinow, J.; Kahn, E.; Jannin, B.; Latruffe, N. Antiproliferative Activities of Resveratrol and Related Compounds in Human Hepatocyte Derived HepG2 Cells Are Associated with Biochemical Cell Disturbance Revealed by Fluorescence Analyses. *Biochimie* **2008**, *90*, 1674–1684, doi:10.1016/j.biochi.2008.06.006.
19. Barjot, C.; Tournaire, M.; Castagnino, C.; Vigor, C.; Vercauteren, J.; Rossi, J.F. Evaluation of Antitumor Effects of Two Vine Stalk Oligomers of Resveratrol on a Panel of Lymphoid and Myeloid Cell Lines: Comparison with Resveratrol. *Life Sciences* **2007**, *81*, 1565–1574, doi:10.1016/j.lfs.2007.08.047.

20. Nivelles, L.; Aires, V.; Rioult, D.; Martiny, L.; Tarpin, M.; Delmas, D. Molecular Analysis of Differential Antiproliferative Activity of Resveratrol, Epsilon Viniferin and Labruscol on Melanoma Cells and Normal Dermal Cells. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *116*, 323–334, doi:10.1016/j.fct.2018.04.043.
21. Özdemir, F.; İncesu, Z.; Şena, M.; Önder, N.İ.; Dikme, M. Implications of Enhanced Effectiveness of Vincristine Sulfate/ $\epsilon$ -Viniferin Combination Compared to Vincristine Sulfate Only on HepG2 Cells. *Dicle Tıp Dergisi* **2016**, *43*, 534–541.
22. Özdemir, F.; Apaydın, E.; Önder, N.İ.; Şen, M.; Ayırım, A.; Ögünç, Y.; İncesu, Z. Apoptotic Effects of  $\epsilon$ -Viniferin in Combination with Cis-Platin in C6 Cells. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 1061–1073, doi:10.1007/s10616-018-0197-5.
23. Ha, D.T.; Chen, Q.C.; Hung, T.M.; Youn, U.J.; Ngoc, T.M.; Thuong, P.T.; Kim, H.J.; Seong, Y.H.; Min, B.S.; Bae, K. Stilbenes and Oligostilbenes from Leaf and Stem of *Vitis Amurensis* and Their Cytotoxic Activity. *Archives of Pharmacal Research* **2009**, *32*, 177–183, doi:10.1007/s12272-009-1132-2.
24. Marel, A.K.; Lizard, G.; Izard, J.C.; Latruffe, N.; Delmas, D. Inhibitory Effects of Trans-Resveratrol Analogs Molecules on the Proliferation and the Cell Cycle Progression of Human Colon Tumoral Cells. *Molecular Nutrition and Food Research* **2008**, *52*, 538–548, doi:10.1002/mnfr.200700185.
25. Lee, S.; Mailar, K.; il Kim, M.; Park, M.; Kim, J.; Min, D.H.; Heo, T.H.; Bae, S.K.; Choi, W.; Lee, C. Plant-Derived Purification, Chemical Synthesis, and in Vitro/in Vivo Evaluation of a Resveratrol Dimer, Viniferin, as an HCV Replication Inhibitor. *Viruses* **2019**, *11*, 1–18, doi:10.3390/v11100890.
26. Yáñez, M.; Fraiz, N.; Cano, E.; Orallo, F. (-)-Trans- $\epsilon$ -Viniferin, a Polyphenol Present in Wines, Is an Inhibitor of Noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine Uptake and of Monoamine Oxidase Activity. *European Journal of Pharmacology* **2006**, *542*, 54–60, doi:10.1016/j.ejphar.2006.06.005.
27. Zghonda, N.; Yoshida, S.; Araki, M.; Kusunoki, M.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Miyazaki, H. Greater Effectiveness of  $\epsilon$ -Viniferin in Red Wine than Its Monomer Resveratrol for Inhibiting Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2011**, *75*, 1259–1267, doi:10.1271/bbb.110022.
28. Zghonda, N.; Yoshida, S.; Ezaki, S.; Otake, Y.; Murakami, C.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Miyazaki, H.  $\epsilon$ -Viniferin Is More Effective than Its Monomer Resveratrol in Improving the Functions of Vascular Endothelial Cells and the Heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76*, 954–960, doi:10.1271/bbb.110975.
29. Ohara, K.; Kusano, K.; Kitao, S.; Yanai, T.; Takata, R.; Kanauchi, O.  $\epsilon$ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, Prevents Diet-Induced Obesity in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *468*, 877–882, doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.047.
30. Lu, Y.L.; Lin, S.Y.; Fang, S.U.; Hsieh, Y.Y.; Chen, C.R.; Wen, C.L.; Chang, C.I.; Hou, W.C. Hot-Water Extracts from Roots of *Vitis Thunbergii* Var. *Taiwaniana* and Identified  $\sigma$ -Viniferin Improve Obesity in High-Fat Diet-Induced Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 2521–2529, doi:10.1021/acs.jafc.7b00327.
31. Kim, J.; Min, J.S.; Kim, D.; Zheng, Y.F.; Mailar, K.; Choi, W.J.; Lee, C.; Bae, S.K. A Simple and Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Trans- $\epsilon$ -Viniferin Quantification in Mouse Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *134*, 116–121, doi:10.1016/j.jpba.2016.11.044.
32. Willenberg, I.; Michael, M.; Wonik, J.; Bartel, L.C.; Empl, M.T.; Schebb, N.H. Investigation of the Absorption of Resveratrol Oligomers in the Caco-2 Cellular Model of Intestinal Absorption. *Food Chemistry* **2015**, *167*, 245–250, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.103.
33. Courtois, A.; Atgié, C.; Marchal, A.; Hornedo-Ortega, R.; Lapèze, C.; Faure, C.; Richard, T.; Krisa, S. Tissue Distribution and Metabolism of Trans- $\epsilon$ -Viniferin after Intraperitoneal Injection in Rat. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10111660.
34. Mao, P.; Lei, Y.; Zhang, T.; Ma, C.; Jin, B.; Li, T. Pharmacokinetics, Bioavailability, Metabolism and Excretion of  $\delta$ -Viniferin in Rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2016**, *6*, 243–252, doi:10.1016/j.apsb.2016.03.008.

35. Lewandowska, U.; Szewczyk, K.; Hrabec, E.; Janecka, A.; Gorlach, S. Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 12183–12199, doi:10.1021/jf404439b.
36. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Resveratrol Encapsulation: Designing Delivery Systems to Overcome Solubility, Stability and Bioavailability Issues. *Trends in Food Science and Technology* **2014**, *38*, 88–103, doi:10.1016/j.tifs.2014.05.003.
37. Lu, W.; Kelly, A.L.; Miao, S. Emulsion-Based Encapsulation and Delivery Systems for Polyphenols. *Trends in Food Science and Technology* **2016**, *47*, 1–9, doi:10.1016/j.TIFS.2015.10.015.
38. Ozkan, G.; Kostka, T.; Esatbeyoglu, T.; Capanoglu, E. Effects of Lipid-Based Encapsulation on the Bioaccessibility and Bioavailability of Phenolic Compounds. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/MOLECULES25235545.
39. Rahim, R.A.; Jayusman, P.A.; Muhammad, N.; Ahmad, F.; Mokhtar, N.; Mohamed, I.N.; Mohamed, N.; Shuid, A.N. Recent Advances in Nanoencapsulation Systems Using Plga of Bioactive Phenolics for Protection against Chronic Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2019**, *16*, doi:10.3390/ijerph16244962.
40. Augustin, M.A.; Abeywardena, M.Y.; Patten, G.; Head, R.; Lockett, T.; de Luca, A.; Sanguansri, L. Effects of Microencapsulation on the Gastrointestinal Transit and Tissue Distribution of a Bioactive Mixture of Fish Oil, Tributyrin and Resveratrol. *Journal of Functional Foods* **2011**, *3*, 25–37, doi:10.1016/j.jff.2011.01.003.
41. Pandita, D.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V. Solid Lipid Nanoparticles Enhance Oral Bioavailability of Resveratrol, a Natural Polyphenol. *Food Research International* **2014**, *62*, 1165–1174, doi:10.1016/j.foodres.2014.05.059.
42. Shaikh, J.; Ankola, D.D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Kumar, M.N.V.R. Nanoparticle Encapsulation Improves Oral Bioavailability of Curcumin by at Least 9-Fold When Compared to Curcumin Administered with Piperine as Absorption Enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *37*, 223–230, doi:10.1016/j.ejps.2009.02.019.
43. Dian, L.; Yu, E.; Chen, X.; Wen, X.; Zhang, Z.; Qin, L.; Wang, Q.; Li, G.; Wu, C. Enhancing Oral Bioavailability of Quercetin Using Novel Soluplus Polymeric Micelles. *Nanoscale Research Letters* **2014**, doi:10.1186/1556-276X-9-684.
44. Coimbra, M.; Isacchi, B.; van Bloois, L.; Torano, J.S.; Ket, A.; Wu, X.; Broere, F.; Metselaar, J.M.; Rijcken, C.J.F.; Storm, G.; et al. Improving Solubility and Chemical Stability of Natural Compounds for Medicinal Use by Incorporation into Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *416*, 433–442, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.056.
45. Courtois, A.; Garcia, M.; Krisa, S.; Atgié, C.; Sauvart, P.; Richard, T.; Faure, C. Encapsulation of  $\epsilon$ -Viniferin in Onion-Type Multi-Lamellar Liposomes Increases Its Solubility and Its Photo-Stability and Decreases Its Cytotoxicity on Caco-2 Intestinal Cells. *Food and Function* **2019**, *10*, 2573–2582, doi:10.1039/c9fo00420c.
46. Pimentel-Moral, S.; Teixeira, M.C.; Fernandes, A.R.; Arráez-Román, D.; Martínez-Férez, A.; Segura-Carretero, A.; Souto, E.B. Lipid Nanocarriers for the Loading of Polyphenols – A Comprehensive Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, *260*, 85–94.
47. Huang, M.; Su, E.; Zheng, F.; Tan, C. Encapsulation of Flavonoids in Liposomal Delivery Systems: The Case of Quercetin, Kaempferol and Luteolin. *Food and Function* **2017**, *8*, 3198–3208, doi:10.1039/c7fo00508c.
48. Beaumont, P.; Courtois, A.; Richard, T.; Krisa, S.; Faure, C. Encapsulation of  $\epsilon$ -Viniferin into Multi-Lamellar Liposomes: Development of a Rapid, Easy and Cost-Efficient Separation Method to Determine the Encapsulation Efficiency. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, NA, doi:10.3390/pharmaceutics13040566.
49. Biais, B.; Krisa, S.; Cluzet, S.; da Costa, G.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J.M.; Richard, T. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 4952–4960, doi:10.1021/acs.jafc.7b01254.
50. Courtois, A.; Jourdes, M.; Dupin, A.; Lapèze, C.; Renouf, E.; Biais, B.; Teissedre, P.L.; Mérillon, J.M.; Richard, T.; Krisa, S. In Vitro Glucuronidation and Sulfation of  $\epsilon$ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22050733.
51. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes (Text with EEA Relevance).

52. Fda; Cder *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations*; 2018;
53. Medicines Agency, E. 2\*\* *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on Bioanalytical Method Validation*; 1922;
54. Liu, Q.; Liao, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Luo, J.; Kong, L. Development and Validation of a Sensitive and Selective LC-MS/MS Method for the Determination of Trans  $\delta$ -Veniferin, a Resveratrol Dehydrodimer, in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetics and Bioavailability Studies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2014**, *958*, 124–129, doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.026.
55. Li, S.; Xie, X.; Li, D.; Yu, Z.; Tong, L.; Zhao, Y. Simultaneous Determination and Tissue Distribution Studies of Four Phenolic Acids in Rat Tissue by UFLC–MS/MS after Intravenous Administration of Salvianolic Acid for Injection. *Biomedical Chromatography* **2018**, *32*, doi:10.1002/bmc.4128.
56. Su, M.X.; Di, B.; Hang, T.J.; Wang, J.; Yang, D.S.; Wang, T.H.; Meng, R. Rapid, Sensitive and Selective Analysis of Trans-Resveratrol in Rat Plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia* **2011**, *73*, 1203–1210, doi:10.1007/s10337-011-2036-0.
57. Chen, L.; Weng, Q.; Ma, J. A New UPLC-MS/MS Method Validated for Quantification of Jervine in Rat Plasma and the Study of Its Pharmacokinetics in Rats. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/5163625.
58. Alam, M.A.; Al-Jenoobi, F.I.; Al-Mohizea, A.M. Rapid, Validated UPLC-MS/MS Method for Determination of Glibenclamide in Rat Plasma. *International Journal of Analytical Chemistry* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/2569027.
59. de Baere, S.; Croubels, S.; Novak, B.; Bichl, G.; Antonissen, G. Development and Validation of a UPLC-MS/MS and UPLC-HR-MS Method for the Determination of Fumonisin B1 and Its Hydrolysed Metabolites and Fumonisin B2 in Broiler Chicken Plasma. *Toxins* **2018**, *10*, 4–7, doi:10.3390/toxins10020062.
60. Jarosova, V.; Vesely, O.; Duskocil, I.; Tomisova, K.; Marsik, P.; Jaimes, J.D.; Smejkal, K.; Kloucek, P.; Havlik, J. Metabolism of Cis- and Trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients* **2020**, *Vol. 12*, Page 595 **2020**, *12*, 595, doi:10.3390/NU12030595.
61. Zhang, B.; Xu, Y.; Lv, H.; Pang, W.; Wang, J.; Ma, H.; Wang, S. Intestinal Pharmacokinetics of Resveratrol and Regulatory Effects of Resveratrol Metabolites on Gut Barrier and Gut Microbiota. *Food Chemistry* **2021**, *357*, 129532, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129532.
62. Yang, L.-L.; Xiao, N.; Li, X.-W.; Fan, Y.; Alolga, R.N.; Sun, X.-Y.; Wang, S.-L.; Li, P.; Lian, & Qi, W. Pharmacokinetic Comparison between Quercetin and Quercetin 3-O- $\beta$ -Glucuronide in Rats by UHPLC-MS/MS OPEN. *Nature Publishing Group* **2016**, doi:10.1038/srep35460.
63. Deng, L.; Li, Y.; Zhang, X.; Chen, B.; Deng, Y.; Li, Y. UPLC–MS Method for Quantification of Pterostilbene and Its Application to Comparative Study of Bioavailability and Tissue Distribution in Normal and Lewis Lung Carcinoma Bearing Mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, *114*, 200–207, doi:10.1016/J.JPBA.2015.04.045.
64. Almeida, L.; Vaz-da-Silva, M.; Falcão, A.; Soares, E.; Costa, R.; Loureiro, A.I.; Fernandes-Lopes, C.; Rocha, J.F.; Nunes, T.; Wright, L.; et al. Pharmacokinetic and Safety Profile of Trans-Resveratrol in a Rising Multiple-Dose Study in Healthy Volunteers. *Molecular Nutrition and Food Research* **2009**, *53*, doi:10.1002/MNFR.200800177.
65. Kapetanovic, I.M.; Muzzio, M.; Huang, Z.; Thompson, T.N.; McCormick, D.L. Pharmacokinetics, Oral Bioavailability, and Metabolic Profile of Resveratrol and Its Dimethylether Analog, Pterostilbene, in Rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2011**, *68*, 593, doi:10.1007/S00280-010-1525-4.
66. Fan, Y.; Zhao, L.; Huang, X.; Jia, Q.; Wang, W.; Gao, M.; Jia, X.; Chang, Y.; Ouyang, H.; He, J. Pharmacokinetic and Bioavailability Studies of  $\alpha$ -Viniferin after Intravenous and Oral Administration to Rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, *188*, 113376, doi:10.1016/J.JPBA.2020.113376.

67. Hofmann, A.F. Overview: Enterohepatic Circulation of Bile Acids — a Topic in Molecular Physiology. *Bile Acids in Health and Disease* **1988**, 1–18, doi:10.1007/978-94-009-1249-6\_1.
68. Zhou, X.; Cassidy, K.C.; Hudson, L.; Mohutsky, M.A.; Sawada, G.A.; Hao, J. Enterohepatic Circulation of Glucuronide Metabolites of Drugs in Dog. *Pharmacology Research & Perspectives* **2019**, *7*, 502, doi:10.1002/PRP2.502.
69. Freund, O. Biodistribution and Gastrointestinal Drug Delivery of New Lipidic Multilamellar Vesicles. *Drug Delivery* **2001**, *8*, 239–244, doi:10.1080/107175401317245921.
70. Freund, O.; Amédee, J.; Roux, D.; Laversanne, R. In Vitro and in Vivo Stability of New Multilamellar Vesicles. *Life Sciences* **2000**, *67*, 411–419, doi:10.1016/S0024-3205(00)00640-8.
71. Luca, S.V.; Macovei, I.; Bujor, A.; Miron, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Aprotosoiaie, A.C.; Trifan, A. Bioactivity of Dietary Polyphenols: The Role of Metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, *60*, 626–659, doi:10.1080/10408398.2018.1546669.
72. Trepiana, J.; Krisa, S.; Portillo, M.P. Activity of Pterostilbene Metabolites against Liver Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/MOLECULES25225444.
73. Trepiana, J.; Krisa, S.; Renouf, E.; Portillo, M.P. Resveratrol Metabolites Are Able to Reduce Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1–17, doi:10.3390/PH13100285.
74. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obesity and metabolism* **2010**, *7*, 64–65, doi:10.14341/2071-8713-5212.



### **2.3 Discussions sur la pharmacocinétique et la distribution tissulaire de l'ε-viniférine encapsulée et non encapsulée chez le rat**

Dans cette étude, nous avons montré une importante glucuronidation (principalement en l'isoforme 1, VG1, majoritaire, suivi de VG4, minoritaire) issue du **métabolisme hépatique mais également intestinal** de la molécule mère après administration orale. De plus, une **probable circulation entéro-hépatique des formes glucuronides** permet de prolonger le temps de présence de ces composés dans l'organisme.

Cependant, les résultats de cette étude ne nous permettent pas de connaître la structure de la molécule qui regagne les intestins par les canalicules biliaires. En effet, il se pourrait que les métabolites glucuronidés rejoignent les intestins et soient absorbés de nouveau, ou que ce soit la forme native qui regagne la lumière intestinale et soit métabolisée à ce niveau. Des analyses du contenu de la bile permettraient de comprendre sous quelle forme l'ε-viniférine rejoint les intestins depuis le foie. Des études sur d'autres stilbènes ont montré la prédominance des formes glucuronidées dans la bile après administration par voie orale de picéide [272], ou de resvératrol [273], suggérant que ce sont les formes métabolisées qui gagneraient les intestins par excrétion biliaire.

Dans cette étude, aucun métabolite autre que les glucuronides n'a été détecté dans les échantillons. Il est possible que les métabolites sulfo-conjugués ou d'autres composés issus du métabolisme du microbiote intestinal soient en dessous des seuils de détection de la méthode analytique. Le développement d'une méthode spécifique à ces composés pourrait faire l'objet d'un travail complémentaire.

L'encapsulation de l'ε-viniférine dans les MLLs a permis de **prolonger l'exposition des glucuronides dans la circulation systémique et d'augmenter de manière significative leurs concentrations dans le foie, les reins et les tissus adipeux mésentériques** 4 heures après administration.

Ce phénomène pourrait s'expliquer par la libération progressive de l'ε-viniférine par destruction des liposomes multilamellaires dans le milieu intestinal. En effet, des expériences sur milieux modèles stomacal et intestinal (réalisées au CBMN) ont montré que le milieu modèle intestinal entraînait une fuite de l'ε-viniférine encapsulée. Cette libération prolongée entraînerait alors un temps d'exposition à l'intestin, et donc au foie, plus long, justifiant la formation d'un plateau.

Dans cette étude, il n'était cependant pas possible de déterminer sous quelle forme (encapsulée ou non) l'ε-viniférine traverse la barrière intestinale. En effet, en plus de l'hypothèse de la destruction des MLLs en milieu intestinal, les MLLs pourraient être internalisés par endocytose, ou par fusion avec la membrane plasmique des entérocytes, comme cela a été suggéré par plusieurs auteurs [254,268–271].

Enfin, il a été mis en évidence, pour la première fois après administration orale **la présence de l'ε-viniférine et de ses métabolites glucuronidés dans les tissus adipeux.**

Les concentrations relativement élevées des composés dans le tissu mésentérique par rapport aux autres tissus adipeux blancs pourraient s'expliquer de différentes façons. D'une part, les composés quantifiés dans le tissu mésentérique pourrait venir des vaisseaux sanguins présents dans ce tissu, étant donné que le mésentère est fortement vascularisé. D'autre part, les composés pourraient venir du système lymphatique. En effet, les intestins et le mésentère partagent le même réseau lymphatique. Les molécules pourraient alors rejoindre le tissu mésentérique sans passer par le système vasculaire [272]. Il a par exemple été montré dans une étude sur le porc, que le resvératrol et ses métabolites glucuronidés pouvaient se trouver dans le système lymphatique, suggérant le possible passage des stilbène dans ce réseau.

Plusieurs processus pourraient expliquer l'accumulation de formes aglycones dans les tissus adipeux blancs (entre 18% et 49%) :

-les formes glucuronidées présentes dans la circulation systémique pourraient, une fois dans le tissu adipeux, subir l'activité de β-glucuronidase et redevenir aglycones. L'activité β-glucuronidase des tissus adipeux pourrait être due aux macrophages de ce tissu [273], capable d'hydrolyser les métabolites glucuronidés, comme cela a été démontré sur certains flavonoïdes [274] ;

-la forme aglycone, bien qu'elle soit largement inférieure aux formes glucuronidées dans le sang, pourrait préférentiellement entrer dans le tissu adipeux. Une autre hypothèse est que ces composés pourraient être transportés par le système lymphatique.

## **Conclusions générales du volume II**

Dans cette partie, l'objectif principal était de déterminer l'impact de l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs sur ses paramètres pharmacocinétiques *in vivo*. Partant du fait que les formes glucuronidées des stilbènes sont souvent majoritaires dans l'organisme après administration, nous avons entrepris de les produire, pour permettre leur quantification spécifique dans le plasma et les tissus de rat.

### **❖ Les méthodes de production par hémisynthèse et de purification des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine ont été optimisées.**

Cela nous a permis d'obtenir les 4 glucuronides de ce stilbène sous forme de poudre en quantités suffisantes pour la suite des travaux.

Le glucuronide VG1 a été utilisé pour la quantification des glucuronides totaux dans l'expérience *in vivo*.

### **❖ L'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine entraîne une augmentation du temps d'exposition de l'organisme aux métabolites glucuronidés.**

Par comparaison avec d'autres études *in vivo* d'administration de formes encapsulées, l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs n'entraîne pas de grandes améliorations des paramètres pharmacocinétiques de la molécule administrée. La principale différence réside dans l'accumulation des formes glucuronidées, supérieures dans certains organes après administration de la forme encapsulée. Bien que nous nous attendions à des variations significatives pour les paramètres pharmacocinétiques de l' $\epsilon$ -viniférine, cette étude *in vivo* a mis en lumière d'autres résultats intéressants.

### **❖ La glucuronidation est plus importante après administration orale qu'après administration en IP.**

La production et l'utilisation de VG1 a permis de quantifier spécifiquement les glucuronides et de constater que les concentrations étaient sous-estimées lorsqu'elles étaient exprimées en équivalence  $\epsilon$ -viniférine. Au-delà de ces différences analytiques, l'administration par voie orale entraîne une proportion de glucuronides supérieure, par comparaison à l'administration en IP. Cette différence souligne l'importance du métabolisme intestinal dans la biotransformation de l' $\epsilon$ -viniférine.

### **❖ Les tissus adipeux blancs accumulent la forme aglycone de manière significative.**

Bien que les glucuronides soient également présents, la présence des formes aglycones dans les tissus adipeux blancs est remarquable du fait de sa proportion élevée, par comparaison au foie, au plasma et aux reins, où les glucuronides sont très fortement majoritaires.

*Cette étude sur l'animal a permis de mettre en évidence la très forte glucuronidation de l' $\epsilon$ -viniférine après administration orale, et nous a amené à nous interroger sur les potentielles propriétés biologiques de ces métabolites.*

## **Volume III**

*Propriétés biologiques des métabolites  
glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine sur lignées  
cellulaires d'hépatocytes et de macrophages*

## Introduction

L' $\epsilon$ -viniférine administrée par voie orale a montré des propriétés biologiques intéressantes dans plusieurs études. Ohara *et al.*, en 2015, ont montré une diminution de la prise de poids de souris nourries avec un régime hypercalorique quand celles-ci recevaient de l' $\epsilon$ -viniférine [275]. Cette molécule a également entraîné une diminution de l'accumulation de TG dans le foie, ainsi qu'une diminution de marqueurs de l'inflammation, comme TNF $\alpha$  et *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) [275]. De plus, Liu *et al.*, (2020) ont montré qu'elle permettait la diminution du degré d'inflammation du foie de souris diabétiques, et diminuait la concentration plasmatique de TG [287]. Ces deux études témoignent des propriétés *in vivo* de l' $\epsilon$ -viniférine, notamment dans au niveau de la prévention de l'accumulation de TG dans le foie, et au niveau de l'inflammation associée aux pathologies métaboliques. Ces processus sont responsables du développement de stéatose hépatique non-alcoolique [155].

Dans le volume II de cette thèse, nous avons montré qu'après administration par voie orale de l' $\epsilon$ -viniférine, celle-ci était retrouvée en très grande majorité sous forme glucuronidée dans le foie : les formes glucuronidées représentent plus de 98% des molécules retrouvées. Nous proposons donc l'hypothèse que les glucuronides pourraient être impliqués dans les activités anti-stéatosiques de l' $\epsilon$ -viniférine, à savoir dans la diminution de TG dans le foie, ainsi que dans les activités anti-inflammatoires.

## Objectifs

L'optimisation de la production de glucuronides décrite dans le volume II a permis la production des 4 isoformes de l' $\epsilon$ -viniférine glucuronides. De ce fait, nous avons entrepris d'évaluer leurs activités biologiques sur des lignées cellulaires d'hépatocytes (cellules du foie) et de macrophages (cellules impliquées dans l'inflammation).

Ce volume de thèse est basé sur l'étude *in vitro* des métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine. Il est divisé en plusieurs objectifs.

Le premier est de déterminer les activités des glucuronides sur **l'accumulation des TG dans un modèle cellulaire de stéatose hépatique**. Pour ce faire, la lignée cellulaire AML-12 (*alpha mouse liver 12*) a été utilisée. De plus, les différentes voies impliquées dans le processus d'accumulation des TG ont été étudiées.

Le deuxième objectif est de déterminer les potentielles **activités anti-inflammatoires** des métabolites glucuronidés. L'utilisation de macrophages RAW 264.7 induits en inflammation par ajout de lipopolysaccharides (LPS) permet de mesurer l'impact des molécules sur **la production d'un marqueur inflammatoire par les cellules**.

Enfin, le troisième objectif est de déterminer le devenir des métabolites glucuronidés au contact des deux lignées cellulaires. L'analyse des **milieux de culture** par UPLC-DAD-MS permet donc déterminer si les métabolites subissent des **transformations au contact de ces lignées**.

## 1. Activités des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine sur l'accumulation de triglycérides dans des hépatocytes en culture induits en stéatose

### 1.1 Stratégie, matériel et méthode des expériences sur hépatocytes

Les expériences sur la lignée cellulaire d'hépatocytes AML-12 ont fait l'objet d'une mobilité internationale en collaboration avec le Groupe Nutrition et Obésité de la Faculté de Pharmacie et Sciences des Aliments de l'Université du Pays Basque (Espagne).

L'exposition d'acide palmitique (*palmitic acid*, PA) aux cellules entraîne une accumulation de TG dans les gouttelettes lipidiques de ces cellules, et permet d'induire un état stéatosique. Dans ces expériences, le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine et les 4 glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine ont été exposés aux cellules en présence de PA à deux concentrations : 1 et 10  $\mu$ M. Les dosages de la viabilité cellulaire ainsi que l'accumulation de TG ont été réalisés par colorimétrie.

Afin de déterminer les mécanismes d'action impliqués dans les potentielles diminutions de TG, deux techniques ont été utilisées. Les ARNm de certains gènes impliqués dans les voies métaboliques menant à l'accumulation de lipides (CS, CTP1a, UCP2, DGAT2) ont été dosés par Reverse-Phase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Enfin, les protéines principalement impliquées dans l'accumulation de TG, à savoir l'ACC (phosphorylée), FAS et FATP2, ont été quantifiés par Western Blot et immunodétection.

Dans le but de déterminer le métabolisme des différents stilbènes au contact de la lignée cellulaire d'hépatocytes, les milieux de culture ont été récoltés et analysés à Bordeaux, grâce aux outils analytiques de l'axe MIB. Les détails du matériel et des méthodes utilisées pour réaliser ces expériences sont présentées dans l'article associé à ces expériences (page 162).

## 1.2 Résultats et discussion des expériences sur hépatocytes

Dans ces expériences, la lignée cellulaire d'hépatocyte AML-12 a été exposée à l'acide palmitique pour induire l'accumulation des TG. Les images de microscopie optique présentées en Figure 36 témoignent de l'accumulation des TG (Figure 36, C) alors stockés dans les gouttelettes lipidiques des cellules.

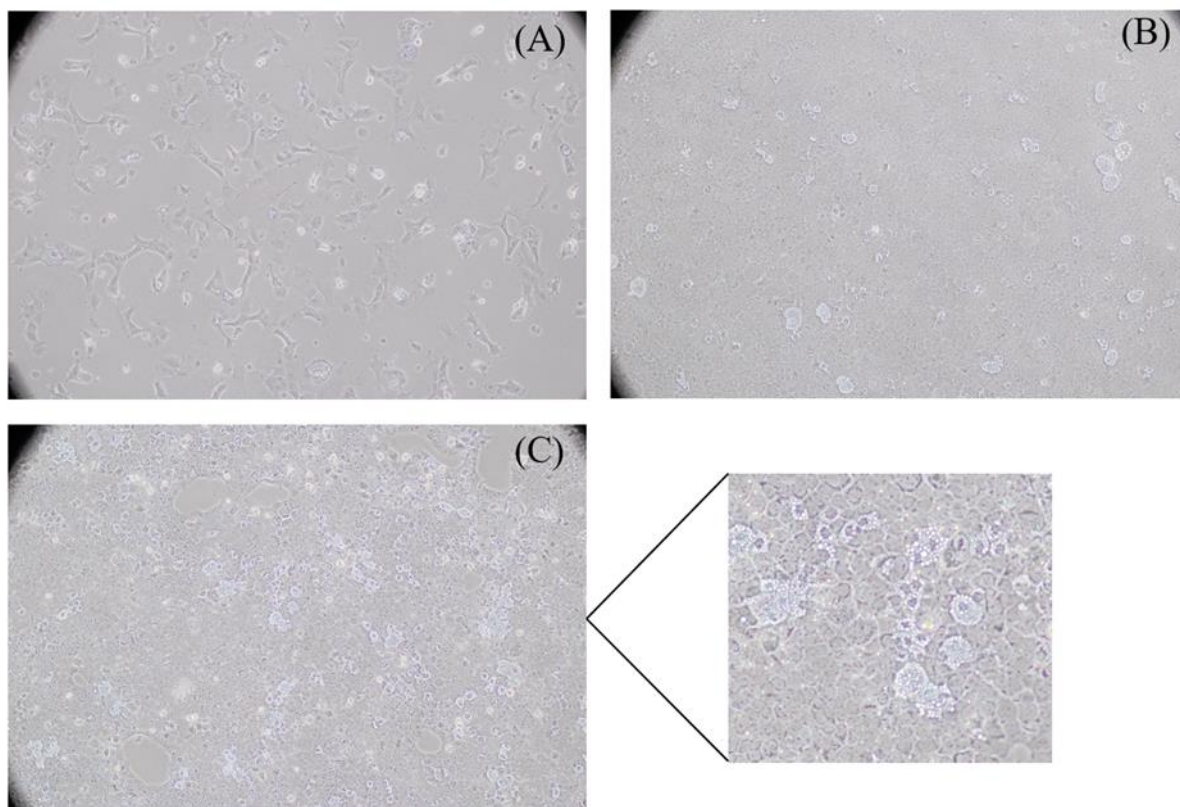


Figure 36. Images en microscope optique (objectif x40) des cellules AML12 (A) avant confluence, (B) à confluence et (C) après induction de l'état stéatosique par exposition au PA

Les résultats des expériences sur hépatocytes sont présentés ci-après sous la forme d'un article scientifique. Après analyse et discussions des résultats, il s'est avéré que cette étude nécessitait des expériences complémentaires actuellement en cours, afin d'appuyer les résultats et enrichir la discussion, notamment sur le métabolisme de VG1 au contact des cellules (dosage des métabolites intracellulaires).

Cet article s'intitule "**Glucuronide metabolites of trans- $\epsilon$ -viniferin decrease triglycerides accumulation on in vitro model of hepatic steatosis**".

## **Glucuronide metabolites of *trans- $\epsilon$ -viniferin* decrease triglycerides accumulation on *in vitro* model of hepatic steatosis**

Pauline Beaumont<sup>1,2</sup>, Arnaud Courtois<sup>1,2,3</sup>, Tristan Richard<sup>1,2</sup>, Michael Jourdes<sup>1,2</sup>, Stéphanie Krisa<sup>1,2</sup>, Itziar Eseberri<sup>4,5,6\*</sup>, Maria P. Portillo<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup> UR CEnologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon, France ;

<sup>2</sup> Bordeaux INP, UR CEnologie, MIB, EA 4577, USC 1366 INRAE, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>3</sup> Centre Antipoison et de Toxicovigilance de Nouvelle Aquitaine, Bâtiment UNDR, CHU de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France

<sup>4</sup> Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Center, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain;

<sup>5</sup> BIOARABA Institute of Health, 01009 Vitoria-Gasteiz, Spain

<sup>6</sup> CIBEROBN Physiopathology of Obesity and Nutrition, Institute of Health Carlos III (ISCIII), 28029 Vitoria-Gasteiz, Spain

\* Correspondence: itziar.eseberri@ehu.eus, Tel.: +34-945014363; Fax: +34-945013014

### **Abstract**

*Trans- $\epsilon$ -viniferin*, a resveratrol dimer found mainly in grapevine wood, has shown protective capacities against hepatic steatosis *in vivo*. On the other hand, this compound is very poorly bioavailable, notably due to its phase II metabolism and its biotransformation into glucuronide metabolites. The aim of this study was to determine the potential delipidating properties of  $\epsilon$ -viniferin and its 4 glucuronide metabolites in a cell model of hepatic steatosis. Cytotoxicity and accumulation of intracellular triglycerides were measured after exposure of AML12 hepatocyte cells to  $\epsilon$ -viniferin, its 4 glucuronides and resveratrol at 1 and 10  $\mu$ M. An analysis of the mechanisms involved in delipidating effects was carried out by measuring gene expression by RT-PCR and proteins by western blot involved in triglyceride metabolism. The cell culture media were analysed by UPLC-DAD to determine potential degradation or metabolism of the tested compounds. As a result, we showed that one of the glucuronides had interesting delipidating properties, notably by acting on the *de novo* lipogenesis pathway. It also appeared that this compound was not cleaved in cells, just as the parent molecule,  $\epsilon$ -viniferin, is not metabolized by this hepatocyte line. The glucuronides of  $\epsilon$ -viniferin would therefore be partly responsible for the anti-hepatic steatosis properties of the parent compound.

**Keywords:**  $\epsilon$ -viniferin, liver steatosis, glucuronide metabolites, AML12-hepatocytes, resveratrol dimer



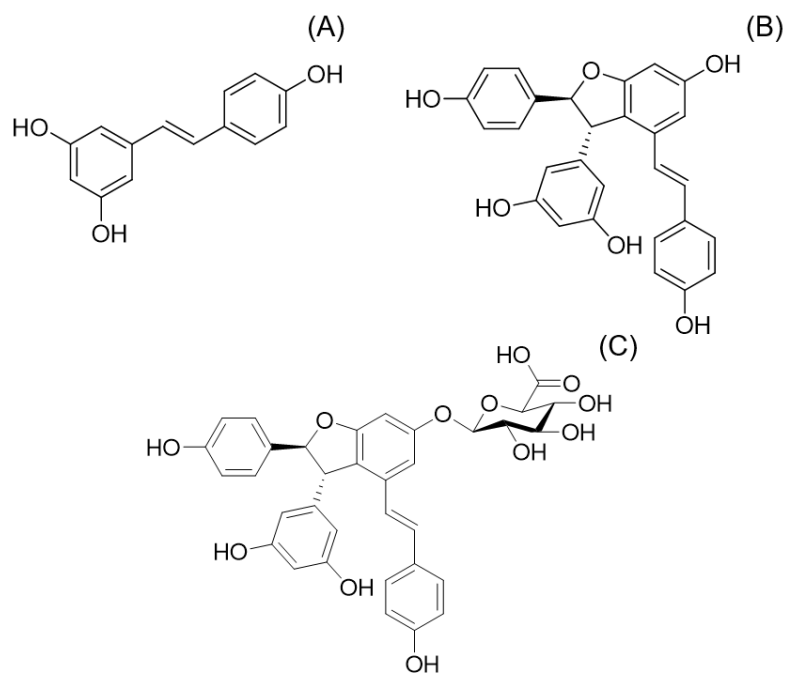
## 1. Introduction

Obesity is a scourge that affects more than 650 million people around the world<sup>1</sup>. This disease leads to the development of many pathologies such as type II diabetes, hypertension and cancer. Obesity is also involved in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)<sup>2</sup>. NAFLD is defined as an excessive fat accumulation in the liver, leading to a broad spectrum of diseases, from hepatic steatosis to steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), cirrhosis and cancer<sup>3</sup>. The worldwide prevalence of NAFLD is about 25%, but there is not a standardized treatment for this disease<sup>4</sup>. For this reason, the use of natural compounds is of definite interest in the aim of developing natural active ingredients in the help of preventing and treating this disease.

*Trans-ε-viniferin* ( $\epsilon$ Vin, Figure 1B) is a resveratrol (RSV) dimer belonging to the stilbene family<sup>5,6</sup>. This compound is found in many families of plants such as *Fabaceae*, *Cyperaceae*, *Iridaceae*, *Gnetaceae* and *Vitaceae*<sup>7</sup>. In the latter family, it has been shown that this compound accumulates mainly in wood of *Vitis vinifera*<sup>8</sup>. Therefore, many stilbenes extracts from *Vitis vinifera* contain this molecule. For human consumption,  $\epsilon$ Vin is found in grapes and its derivatives products such as juices and red wine<sup>9,10</sup>. Although its monomer, resveratrol, is the most studied stilbene for its numerous biological properties<sup>11</sup>,  $\epsilon$ Vin also exhibits interesting biological functions that have been shown in numerous studies [Beaumont *et al.*, 2021a accepted with minor revisions].

In addition to its antioxidant and anti-inflammatory properties common to several other stilbenes<sup>12–15</sup>,  $\epsilon$ Vin has shown to exert positive effects in vascular and neuronal protection<sup>16–19</sup>, and also against cancer<sup>20–22</sup>. Finally, it has been reported that  $\epsilon$ Vin present anti-obesity activities; indeed, this stilbene decreases lipid accumulation on 3T3-L1 adipocytes in *in vitro* experiments and also on animals after its oral administration<sup>23–25</sup>. Specifically,  $\epsilon$ Vin has shown promising effects in obese mice, feed with a high fat diet; after oral administration of  $\epsilon$ Vin, a reduction in weight gain and white adipose tissue weights have been observed, in comparison with the control group<sup>23,25</sup>. Moreover, the observed reduction in the amount of mRNA of inflammation markers, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), testifies the potential role of  $\epsilon$ Vin in the protection against obesity-related pathologies. This delipidating effects are explained by a lipolytic stimulation through an increase in adipose triglyceride lipase (ATGL) activity and a reduction in adipocyte differentiation and *de novo* lipogenesis, *via* reduction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and fatty acid synthase (FAS) expression, respectively<sup>23,24</sup>.

On the other hand, it has been shown that  $\epsilon$ Vin is very poorly bioavailable. Indeed, Kim *et al.* estimated its bioavailability at 0.77% after an oral administration of 40 mg/kg body weight in mice<sup>26</sup>. This is explained on the one hand by a low intestinal absorption (measured *in vitro* with the Caco-2 cell model<sup>27</sup>) and on the other hand by a rapid metabolism, demonstrated *in vitro* on hepatic fraction of rats and humans<sup>28</sup>. In 2018, Courtois *et al.*, demonstrated a strong *in vivo* glucuronidation of  $\epsilon$ Vin after intraperitoneal administration in rats, especially into one isoform of the four possible conformations of viniferin-glucuronide<sup>29</sup>. More recently, we highlighted a stronger glucuronidation and prolonged exposure time to glucuronide forms after its oral administration thanks to the encapsulation of  $\epsilon$ Vin in multilamellar liposomes [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted]. In this study, we found that the rat liver contained more than 60 times more glucuronides than the native form.



**Figure 1.** Structure of (A) *trans*-resveratrol, (B) *trans*- $\epsilon$ -viniferin and (C) VG1

Despite the very low bioavailability of  $\epsilon$ Vin, it has been shown that it exerts delipidating effects in the liver<sup>25</sup>. Thus, as recent studies have shown that glucuronide metabolites of other stilbenes, such as resveratrol and pterostilbene, are involved in the decrease of triglycerides accumulation in a hepatocyte cell line (AML-12)<sup>30,31</sup> especially by acting on *de novo* lipogenesis pathway, our hypothesis was that the glucuronide metabolites of  $\epsilon$ Vin can be totally or partially responsible ones of such effect.

Taking all this information into account, the present study aims to investigate the potential delipidating effects of the four glucuronides of  $\epsilon$ Vin in an *in vitro* model of fatty liver by using palmitic acid (PA)-treated AML-12 cells. After production by hemisynthesis and purification of the four  $\epsilon$ Vin glucuronides, their ability in reducing triglyceride (TG) accumulation on cultured hepatocytes was tested and compared with those of RSV and  $\epsilon$ Vin.

## 2. Material and Method

### 2.1 Chemical and reagents

For cells culture, Dulbecco modified Eagles minimal essential medium (DMEM)/HAM's F12 (F-12 Nutrientmedium) Glutamax, insulin, transferrin and selenium were obtained from Thermofisher (Waltham, MA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Corning (New York, NY, USA). Antibiotics (streptomycin and penicillin) and trypsin/EDTA were obtained from Lonza (Basilea, Switzerland). The palmitic acid (PA) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Concerning hemisynthesis and UPLC-DAD-MS analysis, acetobromo-glucuronic acid methyl-ester, pyridine, and  $K_2CO_3$  were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France); and ultra-pure methanol, ethanol, acetonitrile, ethyl acetate and formic acid were purchased from Fisher Scientific. Milli-Q water used for these experiments was produced in the laboratory using Purelab Ultra System (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).

## 2.2 Stilbenes and metabolites production

*Trans*-resveratrol and *trans*- $\epsilon$ -viniferin were extracted from wood of *Vitis vinifera* as previously described<sup>32</sup>, using solid/liquid and liquid/liquid extraction before separation and purification by counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography, respectively. Purities were measured by UPLC-DAD-MS and <sup>1</sup>H NMR and were superior to 89% for  $\epsilon$ Vin and 95% for RSV.

The four isoforms of  $\epsilon$ -viniferin-glucuronides were produced by hemisynthesis reaction as previously developed<sup>28</sup> with some modifications and using K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> as base as previously described [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted]. To purify a relatively large amount of the different compounds, the production was pre-purified by three consecutive liquid/liquid extraction with ethyl acetate / water (50:50, v:v) before drying the organic phase and injecting it in semi-preparative high performance liquid chromatography. Separation parameters used to purify the 4 compounds and non-transformed  $\epsilon$ Vin was the same that previously described [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted].

## 2.2 Cell culture and treatments

Mouse hepatocytes AML12 were purchased from ATCC (ATCC®CRL-2254™, Manassas, VA, USA). They grew in a media made up of DMEM/HAM's F12 Glutamax with 10% heat inactivated FBS, 5  $\mu$ g/mL of insulin, 5  $\mu$ g/mL of transferrin, 5 ng/mL of selenium, 40 ng/mL of dexamethasone and 1 % of antibiotics (penicillin/streptomycin, 10,000 U/mL). They were maintained at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>, in 75 cm<sup>2</sup> flasks. After the experimental period, cells were harvested with trypsin-EDTA to perform subsequent determinations.

To induce TG accumulation in cells and therefore mimic hepatic steatosis, they were exposed to 300  $\mu$ M of PA during 18h. These conditions have been previously optimized to achieve significant accumulation of TG without compromising cell viability<sup>31</sup>. For the treatment, hepatocytes were co-incubated for 18h with PA and the 6 molecules (RSV,  $\epsilon$ Vin and its four glucuronide isoforms, diluted in 95% of ethanol) at 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. The experiments were repeated three times.

## 2.3 Cytotoxicity tests and quantification of TG content

For cytotoxicity test, Crystal Violet coloration was used to determine the living cells. Briefly, after having washed cells extensively with sterile phosphate buffer saline (PBS), cells were fixed with formaldehyde (3.7%), and stained with 0.25% crystal violet (20 min, dark). Crystals formed were solubilized in acetic acid (33%), and optical density was measured at 590 nm with an iMark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell viability was determined in comparison with non-treated cells.

To quantify TG, cells were washed with sterile PBS, and harvested with a buffer containing Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA with phenylmethylsulfonyl fluoride. Each sample was sonicated (5-second burst in a Branson Sonifier SFX550, Saint Louis, MO, USA) and kept at -20°C until TG quantification. This analysis was performed using a commercial kit (Spinreact, Girona, Spain) and following manufacturer's instructions. Results were standardized by measuring the protein content of each well using the Bradford method<sup>33</sup>, and then expressed in mg of TG per mg of protein.

## 2.4 RNA extraction and RT-PCR

For RNA extraction, cells were intensively washed with sterile PBS and the RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The extracted RNA content and purity were checked and then, RNA samples were treated using DNase I kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) to remove

DNA contamination. After that, complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription of 1.5 µg of RNA using iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The different mRNA levels were determined by Real-Time PCR with an iCycler™ - MyiQ™ Real Time PCR Detection System (BioRad, Hercules, CA, USA). 4.75 µl of diluted cDNA, the upstream and downstream primers (300 nM) and SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), were used in a total volume of 15 µL for carnitine palmitoyl transferase 1a (CPT1a), uncoupling protein 2 (UCP2) and citrate synthase (CS). For diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), TaqMan® Gene Expression Assay was used following the manufacturer's instructions (kit references are Mm00515643\_m1 and Mm01304258\_m1, respectively). mRNA levels of each gene were normalized to β-Actin values. The results were expressed as fold changes of threshold cycle (Ct) value relative to controls by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method<sup>34</sup>.

### 2.5 Protein immunodetection

Protein from cells was extracted and then denaturalized at 95 °C during 5 min in Laemmli buffer. Afterwards, 30 µg of protein were separated by SDS-PAGE Electrophoresis in a 4-15% polyacrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and electroblotted onto PVDF membranes (Millipore, Bradford, MA, USA). Membranes were then incubated overnight with specific primary antibodies for Ser79 phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (pACC, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), FAS (Abcam, Cambridge, UK) and fatty acid transporter protein 2 (FATP2, Santa Cruz Biotech, CA, USA). Then, membranes were incubated with the secondary antibodies and detected by the addition of Forte Western HRP substrate (Millipore; Burlington, MA, USA) and using ChemiDoc™MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The expression of each protein was normalized to α-tubulin (Santa Cruz Biotech, CA, USA) values.

### 2.6 UPLC-DAD analysis

For metabolic profile analysis, media were removed 18 h after treatment initiation, and directly kept at -80°C until analysis. Each sample were then slowly thawed. About 200 µL of media were rigorously vortexed, and centrifuged (30 min 10 000g 4 °C) before UPLC-DAD-MS analysis. Media from cells incubation without treatment and media with treatments but without cells were analysed to evaluate potential co-elution and degradation, respectively.

UPLC separation was performed using a 1290 Infinity UPLC (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France) with the same parameters than previously described<sup>31</sup>. RSV, εVin and ε-viniferin-glucuronide number 1 (VG1) were spiked in solvent (methanol:water, 50:50, v:v) to determine their retention time on the chromatogram at 320 nm.

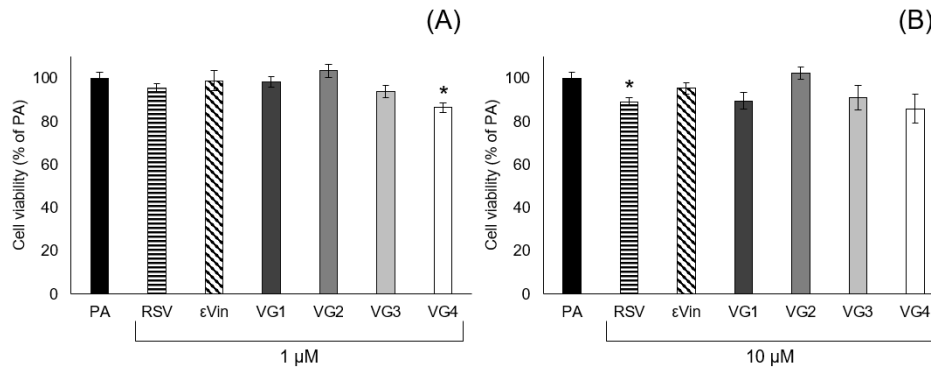
### 2.7 Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using SPSS 24.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Analysed variables were normally distributed, according to Shapiro-Wilk's test. Comparisons between each treated group of cells with either the control hepatocytes or the hepatocytes incubated with PA were performed using Student's t test (with a p-value < 0.05 for significance).

### 3. Results

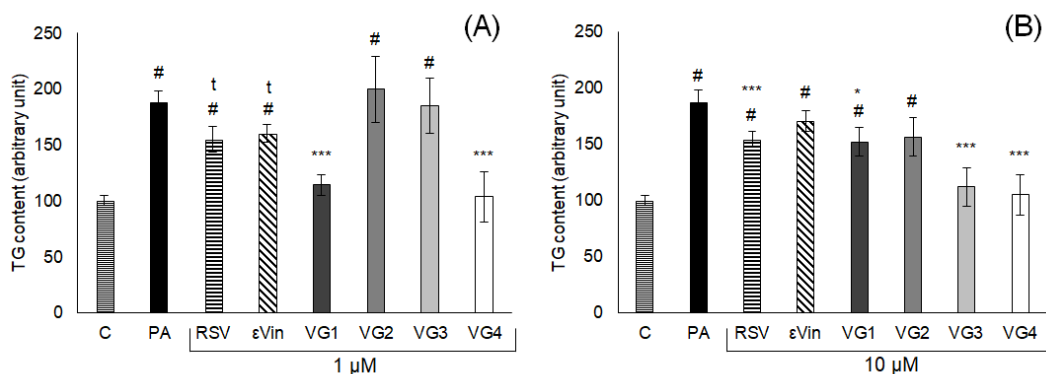
#### 3.1 Effects of RSV, $\epsilon$ Vin and the four $\epsilon$ -viniferin-glucuronides on cell viability and triglycerides content

Crystal Violet assay was performed on cells exposed to RSV,  $\epsilon$ Vin and the four  $\epsilon$ -viniferin-glucuronides, every compound at 1 and 10  $\mu$ M, during 18 h in combination with PA. The cell viability results are shown in Figure 2. At 1  $\mu$ M, only viniferin-glucuronide 4 (VG4) showed a slight cytotoxic effect by reducing the cell viability by 13.5%. For experiments at 10  $\mu$ M, only RSV1 reduced slightly cell viability.



**Figure 2.** Cell viability after incubation of AML12 hepatocytes with RSV,  $\epsilon$ Vin or the four  $\epsilon$ Vin-glucuronides at 1  $\mu$ M (A) or 10  $\mu$ M (B) in combination with 300  $\mu$ M of PA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Each group was compared with PA condition. \*:  $P < 0.05$ .

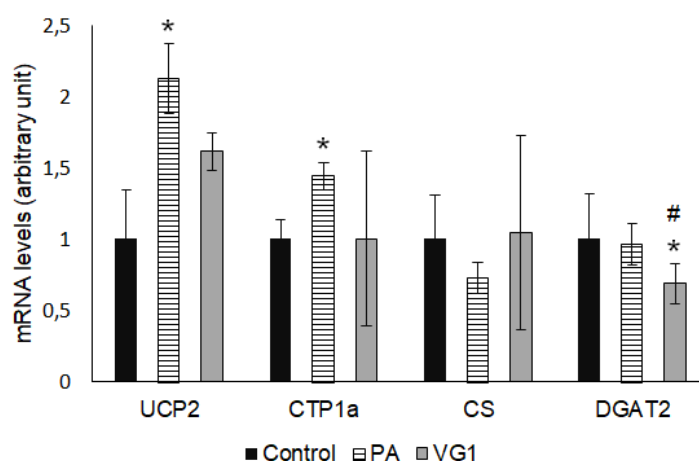
Figure 3 represents the accumulation of TG in cells after incubation with different molecules at 1 or 10  $\mu$ M. The incubation of AML12 hepatocytes with 300  $\mu$ M of PA for 18 h induced a significant increase in TG accumulation ( $187 \pm 11\%$  in comparison with the control group), thus testifying the induction of *in vitro* hepatic steatosis in cells. After incubation of cells with 1  $\mu$ M of RSV or  $\epsilon$ Vin, the amount of accumulated TG tended to decrease by 17% and 14%, respectively. Regarding the glucuronide metabolites, at 1  $\mu$ M VG1 and VG4 decreased TG accumulation by 39%, and 44%, respectively. At 10  $\mu$ M  $\epsilon$ Vin did not have an effect on TG content, whereas RSV decreased it about 17%. At this concentration, VG1, VG3 and VG4 also showed significant delipidating effects by decreasing TG content by 19%, 40% and 44%, respectively.



**Figure 3.** Accumulation of TG in AML12 hepatocytes after incubation with resveratrol,  $\epsilon$ Vin or the four  $\epsilon$ Vin-glucuronides at 1  $\mu$ M (A) or 10  $\mu$ M (B) in combination with PA (300  $\mu$ M) during 18 h. Data are expressed as mean (% of control)  $\pm$  SEM. #: significantly different from control ( $P < 0.05$ ), \*: significantly different from PA (\*: $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ), t= tendency in comparison with PA condition

### 3.2 Effects of VG1 on the expression of genes involved in TG metabolism

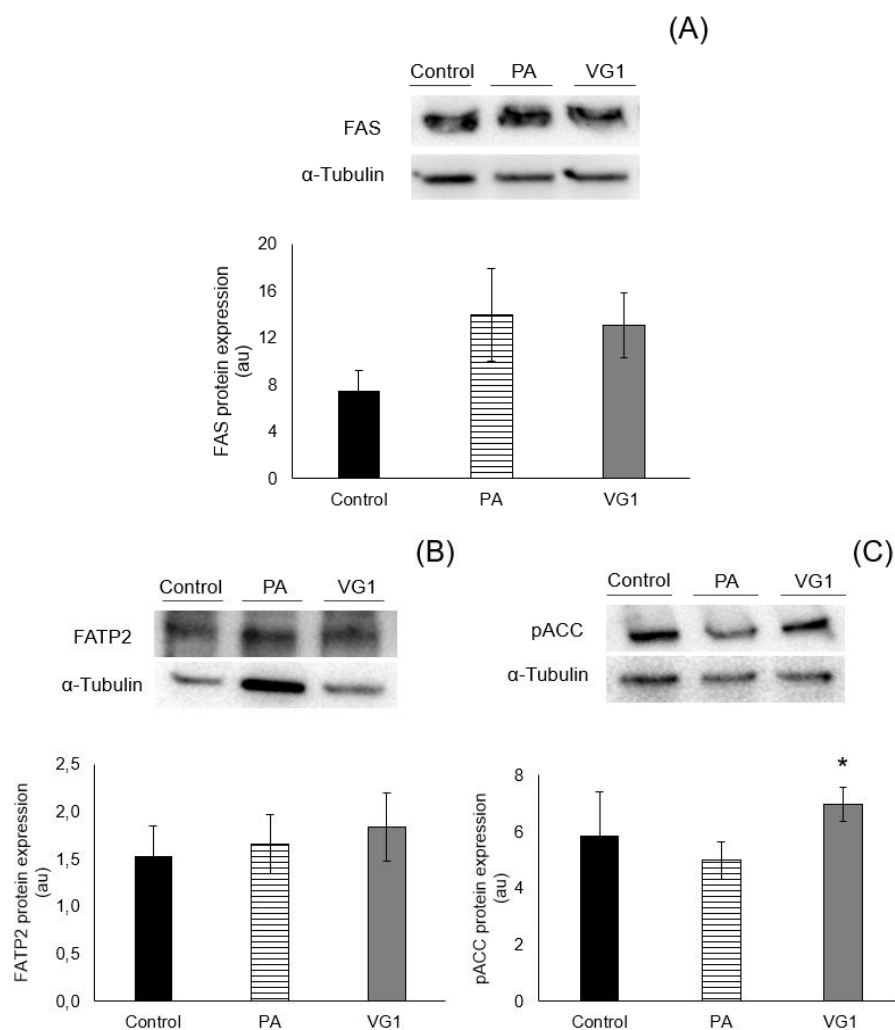
The gene expression study was carried out in an attempt to determine the mechanisms of action of VG1, the glucuronide metabolite of  $\epsilon$ Vin which appeared to be the most active at 1  $\mu$ M in reducing TG accumulation. The expression of four genes involved in lipid metabolism was quantified: UCP2, CTP1a, CS and DGAT2. The results are present in Figure 4. The induction of *in vitro* hepatic steatosis by incubating cells with 300  $\mu$ M of PA resulted in a significant increase in the expression of UCP2 and CTP1a, and a slight but not significant decrease in CS. For DGAT2 expression, no significant difference was observed between the control and the PA groups. On the other hand, cells incubated with PA and VG1 at 1  $\mu$ M decreased the expression of DGAT2.



**Figure 4.** mRNA levels of UCP2, CTP1a, CS and DGAT2 (expressed as arbitrary units) in AML12 hepatocytes after incubation alone (control), with PA, or with PA + VG1. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*: significantly different from control ( $P < 0.05$ ) #: significantly different from PA ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 Effects of VG1 on expression of proteins involved in TG accumulation on AML12 hepatocytes

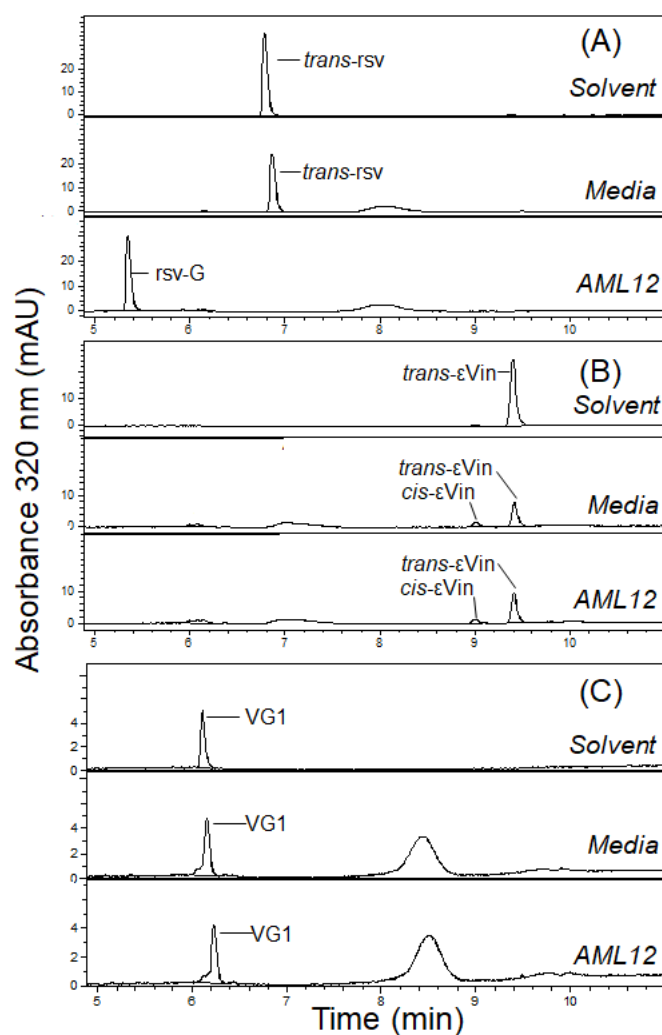
Results of protein expression are shown in Figure 5. The incubation of hepatocytes with VG1 did not have statistically significant effects on the expression of FAS, FATP2 and Ser79 phosphorylated ACC (Figure 5). Regardless, the expression of pACC tended to be increased after cell treatment, suggesting a potential reversion of the ACC inhibition induced by PA stimulation (reduction %;  $P = 0.029$ ) (Figure 5C).



**Figure 5.** Protein expression of FAS (A), FATP2 (B) and pACC (C) after incubation of AML12 hepatocytes with 300  $\mu$ M of palmitic acid (PA) and PA + VG1 for 18 h. The Western blot bands shown are representative of 6 samples/group. Protein expression were normalized by  $\alpha$ -tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM (au). \*:  $p < 0.05$

### 3.3 Metabolic profile of media after hepatocyte treatments

The cell incubation media were analysed in UPLC-DAD at 320 nm. For each compound, the chromatogram of cell media after incubation was compared with the compound spiked in media (without cell) and the compound spiked in solvent. The different chromatograms are shown in Figure 6. After 18 h of incubation with RSV, only a metabolite of RSV, resveratrol-3-O-glucuronide was found in the cell media. Regarding  $\epsilon$ Vin incubation, *cis* forms were also found in cell media with and without cells (Figure 5B). After incubation of AML12 with  $\epsilon$ Vin, some traces of  $\epsilon$ Vin-glucuronides were detected. Finally, the peak corresponding to VG1 remained similar among the different conditions (Figure 6, C). No trace of the aglycon form ( $\epsilon$ Vin) was found in this condition.



**Figure 6.** Chromatogram UPLC-DAD at 320 nm after 10  $\mu$ M of (A) RSV, (B)  $\epsilon$ Vin and (C) VG1 spiked in solvent, cell media or media + AML12 for 18h.

#### 4. Discussion

$\epsilon$ Vin is a stilbene found in relatively large amount in vine roots, sometimes in higher concentrations than RSV<sup>8</sup>. *In vivo* studies have shown anti-obesity properties<sup>25,35</sup> and protection against hepatic steatosis for  $\epsilon$ Vin in rats<sup>36</sup>. However,  $\epsilon$ Vin is poorly bioavailable<sup>26</sup>, notably due to its high glucuronidation<sup>28,29</sup>, a phase II metabolism bio-transformation. Recently, we have shown that, in comparison with the parent compound, the concentration of glucuronide metabolites was up to 108 times higher in the blood and more than 60 times higher in the liver after oral administration of the molecule [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted]. For this reason, we hypothesized that the recently described beneficial effects attributed to  $\epsilon$ Vin could be exerted specifically by its metabolites. Consequently, the aim of the present study was to determine the potential anti-steatotic activity of the main phase II metabolites of  $\epsilon$ Vin in cultured hepatocytes. As far as we know, this is the first time that this analysis has been addressed.

For this purpose, AML12 hepatocytes, treated with PA in order to induce TG accumulation<sup>30,31</sup>, were incubated with 4  $\epsilon$ Vin-glucuronide metabolites, as well as their parent compound ( $\epsilon$ Vin) or RSV. The chosen concentrations were based on those found *in vivo* for RSV in the reported literature<sup>31</sup>, and those in a previous study from our group:  $1.7 \pm 1.1 \mu$ M in plasma for glucuronides and  $0.015 \pm 0.01 \mu$ M for the parent compound, after oral administration of 20 mg/kg body weight of  $\epsilon$ Vin in rats [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted].



At 10  $\mu$ M, whereas RSV partially prevented TG accumulation induced by PA,  $\epsilon$ Vin was ineffective. On the other hand, some of  $\epsilon$ Vin glucuronide metabolites, derived from phase II metabolism, were active. At 1  $\mu$ M, VG1 and VG4 were active, and totally reversed the effects of PA exposure insofar as their TG content were not different from the control condition without PA. The fact that the effect induced by the lowest dose was higher than that induced by the highest dose had been previously demonstrated for quercetin and its metabolites<sup>37</sup>. Also *in vivo* studies, carried out in mice fed an obesogenic diet, observed this phenomenon when the antiobesity effect of resveratrol was assessed, meaning that this is a quite common response pattern to polyphenols or at least to some of them<sup>38</sup>. Interestingly, VG1 and VG4 are the two metabolites found *in vivo* in rats<sup>29</sup> and *in vitro* after exposure to liver fractions to  $\epsilon$ Vin<sup>28</sup>. The analysis of the culture media after incubating cells with 10  $\mu$ M of the studied molecules allowed us to determine the potential metabolism of these compounds. This concentration was chosen to make it possible to move away from the limits of quantification. Thus, after 18 h of incubation, RSV was completely transformed into resveratrol-3-O-glucuronide by the hepatocytes, as it was already shown in a previous study<sup>31</sup>. However, surprisingly, after incubation with  $\epsilon$ Vin, only a few traces of glucuronide metabolites were detected and the parent compound remained present in the incubation medium. It could be hypothesized that  $\epsilon$ Vin is not sensitive to the same Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) isoforms expressed in AML12 than RSV.

The glucuronide metabolites did not appear to be metabolised after the incubation of AML12 hepatocytes. VG1 is the major glucuronide metabolite, both in humans and rat<sup>28</sup>. Although the two tested doses reduced TG accumulation in hepatocytes, 1  $\mu$ M was the most effective one because TG in the cells incubated with this dose reached a similar value as found in the control cells. This fact means that VG1, at the lowest dose, is able to avoid the excessive TG accumulation induced by PA. Considering that this concentration is the closest one to the concentrations found in animals [Beaumont *et al.*, 2021b, submitted], these results could be extrapolated to the *in vivo* situation.

Taking all that into account, the mechanistic studies were performed to gain more insight on the effect of VG1 at 1  $\mu$ M. After gene expression analysis, we observed a decrease in mRNA levels of DGAT2, meaning that a decrease in TG assembly was involved in the observed reduction in TG accumulation. On the other hand, a slight increase in pACC protein expression was found in the cells incubated with this metabolite. As the phosphorylated form of ACC is the inactive form of the enzyme, this result suggests a decrease in free fatty acid synthesis from acetyl-CoA. In another study,  $\epsilon$ Vin exposed to 3T3-L1 adipocytes increased the phosphorylation of AMPK<sup>23</sup>, which once phosphorylated, catalyzes the phosphorylation of ACC. This study gives support to the hypothesis that VG1 can act by inhibiting *de novo* lipogenesis. Changes in the uptake of free fatty acids did not contribute to the delipidating effects of VG1 because FATP2 protein remained unchanged.

Thus, the main glucuronide metabolite of  $\epsilon$ Vin could be responsible for the delipidating properties of the parent molecule observed *in vivo*, which could be done by a partial inhibition of *de novo* lipogenesis. Analysis of the culture media allowed us to confirm that it was indeed the glucuronide form which caused the decrease in TG in the cells as long as the parent compound did not show activity. Moreover, the anti-inflammatory and antioxidant properties of the parent molecule measured *in vitro* could reinforce the effects of this molecule on the protection of the liver against hepatic steatosis and its inflammatory complications<sup>30,31</sup>. Based on previous studies on stilbenes and their metabolites, it would appear that these are not the same proteins impacted by the different molecules<sup>30,31</sup>. This makes it possible to envisage potential synergistic actions, showing the interest of studying pure molecules and their metabolites, but also extracts containing several compounds of interest.

## 5. Conclusion

The main glucuronide metabolite of  $\epsilon$ Vin, VG1, appears to have anti-steatotic properties by decreasing the accumulation of TG in cultured hepatocytes through a potential inhibition of the *de novo* lipogenesis pathway. Although this dimer is poorly bioavailable, this glucuronide metabolite could be at the origin

of, or participate in, the biological activities of the parent molecule measured *in vivo*, and the usefulness of this molecule cannot be discarded.

### Acknowledgements

This study was funded by the University of the Basque Country (grant: GIU18-173) and Carlos III Research Institute (CIBERobn; grant CB12/03/30007). The authors would like to thank the « Consortium Trans-Pyrénéen de Recherches sur l'Obésité et le Diabète », the « Nutrition Méditerranéenne et Santé » and « Initiative d'Excellence » program of the University of Bordeaux for their support and funding.

### References

1. Obesity. Accessed October 16, 2021. [https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)
2. Obesity is feeding the rise in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) across Europe - EASL-The Home of Hepatology. Accessed October 16, 2021. <https://easl.eu/publication/policy-statement-obesity-is-feeding-the-rise-in-non-alcoholic-fatty-liver-disease-nafl-d-across-europe/>
3. Lazarus J v., Colombo M, Cortez-Pinto H, et al. NAFLD — sounding the alarm on a silent epidemic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020 17:7. 2020;17(7):377-379. doi:10.1038/s41575-020-0315-7
4. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851-1864. doi:10.1053/j.gastro.2020.01.052
5. Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*. 1977;16(8):1193-1196. doi:10.1016/S0031-9422(00)94358-9
6. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1977;33(2):151-152. doi:10.1007/BF02124034
7. Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM. Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*. 2012;29(11):1317-1333. doi:10.1039/c2np20049j
8. Gabaston J, Leborgne C, Waffo-Teguo P, et al. Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: A comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis*. 2019;30(3):320-331. doi:10.1002/pca.2815
9. Khawand T el, Courtois A, Valls J, Richard T, Krisa S. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*. 2018;17(5):1007-1029. doi:10.1007/S11101-018-9578-9
10. Benbougerra N, Hornedo-Ortega R, Garcia F, el Khawand T, Saucier C, Richard T. Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;112:362-381. doi:10.1016/j.tifs.2021.03.060
11. Riccio BVF, Fonseca-Santos B, Ferrari PC, Chorilli M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Trans-Resveratrol: A Review. <https://doi.org/10.1080/1040834720191637242>. 2019;50(4):339-358. doi:10.1080/10408347.2019.1637242
12. Nopo-Olazabal C, Hubstenberger J, Nopo-Olazabal L, Medina-Bolivar F. Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 61. J Agric Food Chem; 2013:11744-11758. doi:10.1021/jf400760k
13. Privat C, Telo JP, Bernardes-Genisson V, Vieira A, Souchard JP, Nepveu F. Antioxidant properties of trans- $\epsilon$ -Viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(5):1213-1217. doi:10.1021/jf010676t
14. Sáez V, Pastene E, Vergara C, et al. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, *in vitro* antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*. 2018;265:101-110. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.050
15. Dvorakova M, Landa P. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*. 2017;124:126-145. doi:10.1016/j.phrs.2017.08.002
16. Zhang S, Ma Y, Feng J. Neuroprotective mechanisms of  $\epsilon$ -viniferin in a rotenone-induced cell model of Parkinson's disease: Significance of SIRT3-mediated FOXO3 deacetylation. *Neural Regeneration Research*. 2020;15(11):2143-2153. doi:10.4103/1673-5374.282264
17. Richard T, Pawlus AD, Iglésias ML, et al. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1215(1):103-108. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05865.x
18. Zghonda N, Yoshida S, Ezaki S, et al.  $\epsilon$ -Viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2012;76(5):954-960. doi:10.1271/bbb.110975

19. Zghonda N, Yoshida S, Araki M, et al. Greater effectiveness of  $\epsilon$ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2011;75(7):1259-1267. doi:10.1271/bbb.110022
20. Barjot C, Tournaire M, Castagnino C, Vigor C, Vercauteren J, Rossi JF. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sciences*. 2007;81(23-24):1565-1574. doi:10.1016/j.lfs.2007.08.047
21. Nivelle L, Aires V, Rioult D, Martiny L, Tarpin M, Delmas D. Molecular analysis of differential antiproliferative activity of resveratrol, epsilon viniferin and labruscol on melanoma cells and normal dermal cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;116(October 2017):323-334. doi:10.1016/j.fct.2018.04.043
22. Tarhan S, Özdemir F, İncesu Z, Demirkan ES. Direct and protective effects of single or combined addition of vincristine and  $\epsilon$ -viniferin on human HepG2 cellular oxidative stress markers in vitro. *Cytotechnology*. 2016;68(4):1081-1094. doi:10.1007/s10616-015-9863-z
23. Hung MW, Wu CW, Kokubu D, Yoshida S, Miyazaki H.  $\epsilon$ -viniferin is more effective than resveratrol in promoting favorable adipocyte differentiation with enhanced adiponectin expression and decreased lipid accumulation. *Food Science and Technology Research*. 2019;25(6):817-826. doi:10.3136/fstr.25.817
24. Lu YL, Lin SY, Fang SU, et al. Hot-water extracts from roots of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* and identified  $\sigma$ -viniferin improve obesity in high-fat diet-induced mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(12):2521-2529. doi:10.1021/acs.jafc.7b00327
25. Ohara K, Kusano K, Kitao S, Yanai T, Takata R, Kanauchi O.  $\epsilon$ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;468(4):877-882. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.047
26. Kim J, Min JS, Kim D, et al. A simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for trans- $\epsilon$ -viniferin quantification in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;134:116-121. doi:10.1016/j.jpba.2016.11.044
27. Willenberg I, Michael M, Wonik J, Bartel LC, Empl MT, Schebb NH. Investigation of the absorption of resveratrol oligomers in the Caco-2 cellular model of intestinal absorption. *Food Chemistry*. 2015;167:245-250. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.103
28. Courtois A, Jourdes M, Dupin A, et al. In vitro glucuronidation and sulfation of  $\epsilon$ -viniferin, a resveratrol dimer, in humans and rats. *Molecules*. 2017;22(5). doi:10.3390/molecules22050733
29. Courtois A, Atgié C, Marchal A, et al. Tissue distribution and metabolism of trans- $\epsilon$ -viniferin after intraperitoneal injection in rat. *Nutrients*. 2018;10(11):1-11. doi:10.3390/nu10111660
30. Trepiana J, Krisa S, Portillo MP. Activity of pterostilbene metabolites against liver steatosis in cultured hepatocytes. *Molecules*. 2020;25(22). doi:10.3390/MOLECULES25225444
31. Trepiana J, Krisa S, Renouf E, Portillo MP. Resveratrol metabolites are able to reduce steatosis in cultured hepatocytes. *Pharmaceuticals*. 2020;13(10):1-17. doi:10.3390/ph13100285
32. Biais B, Krisa S, Cluzet S, et al. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(24):4952-4960. doi:10.1021/acs.jafc.7b01254
33. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
35. Lu YL, Lin SY, Fang SU, et al. Hot-Water Extracts from Roots of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* and Identified  $\epsilon$ -Viniferin Improve Obesity in High-Fat Diet-Induced Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(12):2521-2529. doi:10.1021/acs.jafc.7b00327
36. Liu R, Zhang Y, Yao X, Wu Q, Wei M, Yan Z.  $\epsilon$ -Viniferin, a promising natural oligostilbene, ameliorates hyperglycemia and hyperlipidemia by activating AMPK: In vivo. *Food and Function*. 2020;11(11):10084-10093. doi:10.1039/d0fo01932a
37. Eseberri I, Miranda J, Lasa A, et al. Effects of quercetin metabolites on triglyceride metabolism of 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2). doi:10.3390/ijms20020264
38. SJ C, UJ J, MS C. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *The British journal of nutrition*. 2012;108(12):2166-2175. doi:10.1017/S0007114512000347

Beaumont, P., Courtois, A., Atgié, C., Richard, T., & Krisa, S. (2021a). *In the shadow of resveratrol: biological activities of epsilon-viniferin*. *Journal of Physiology and Biochemistry*. [accepted with minor revisions]

Beaumont, P., Faure, C., Courtois, A., Jourdes, M., Marchal, A., Teisse-5 Dre, P.-L., Richard, T., Atgié, C., & Krisa, S. (2021b). Trans- $\epsilon$ -viniferin encapsulation in multi-lamellar liposomes : 2 consequences on pharmacological parameters, biodistribution 3 and glucuronide formation in rats 4. *Nutrients*, 13. <https://doi.org/10.3390/xxxxx> [submitted]

### **1.3 Conclusions sur l'activité des molécules dans un modèle de stéatose hépatique in vitro**

**VG1 et VG4 réduisent l'accumulation de TG** induite par l'acide palmitique de 39% et 44% (respectivement), lorsque les cellules sont exposées à 1  $\mu$ M des composés.

Le dosage des TG nous a permis de mettre en évidence une activité des métabolites glucuronidés sur la diminution de l'accumulation de TG dans des hépatocytes en culture. Dans ces expériences, VG1 et VG4 étaient plus efficaces que leur forme aglycone, l' $\epsilon$ -viniférine. VG1 étant l'isoforme majoritairement retrouvé *in vivo* après administration de la forme aglycone, c'est ce composé qui a été utilisé pour étudier les mécanismes d'action.

**VG1 à 1  $\mu$ M diminue l'expression de DGAT2 et augmente la quantité d'ACC phosphorylée**

DGAT2 est impliqué dans l'assemblage des acides gras en triglycérides. Par ailleurs, le kit commercial utilisé pour le dosage des TG dose en réalité les acides gras libres, après incubation avec une lipoprotéine lipase. De ce fait, ce résultat ne nous permet pas de confirmer que la réduction de l'expression de DGAT2 soit responsable de la diminution des TG accumulés.

Les résultats sur l'ACC phosphorylée pourraient suggérer une action inhibitrice de VG1 dans la lipogenèse *de novo*, comme cela a été montré sur les métabolites du ptérostilbène et du resvératrol [179,277].

Le resvératrol est totalement glucuronidé au contact des hépatocytes, **l' $\epsilon$ -viniférine est peu glucuronidée**

L' $\epsilon$ -viniférine, à l'inverse du resvératrol, ne serait pas métabolisée par UGTs présentes dans cette lignée cellulaire, et des expériences supplémentaires, notamment l'utilisation de différents isoformes des UGTs permettrait de mieux comprendre les enzymes impliquées dans le métabolisme de ce dimère.

## 2. Activités anti-inflammatoires des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine sur macrophages

L'inflammation est une réaction du système immunitaire en réponse à une agression externe par des micro-organismes mais aussi en cas de traumatisme, ou de brûlure par exemple. Au cours du processus inflammatoire aigu, différents types d'effecteurs (cellulaires et moléculaires) se mettent en place et auront pour rôle de contrôler et de lutter contre cette agression. Ce processus est normalement résolutif lorsque l'agression a disparu. Cependant, cette inflammation peut se maintenir, devenir chronique et au final délétère pour l'organisme. D'ailleurs un processus inflammatoire chronique est souvent associé à la physiopathologie de nombreuses maladies comme la stéatose hépatique par exemple.

Un des principaux acteurs cellulaires de l'inflammation est le macrophage qui fait partie de la première ligne de défense. Il présente différents rôles tels que la présentation des antigènes, la phagocytose, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) qui vont pouvoir participer à la régulation du processus inflammatoire, la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou encore la sécrétion de facteurs cytotoxiques comme le monoxyde d'azote (NO).

*In vitro*, il est possible de stimuler le macrophage par un lipopolysaccharide bactérien (LPS, endotoxine présente au niveau de la paroi des bactéries Gram-). Le macrophage stimulé par le LPS associé à la mesure des différents facteurs qu'il sécrète (NO, ERO, cytokines) constitue un modèle d'inflammation couramment utilisé en laboratoire qui permet de mettre en évidence les propriétés anti-inflammatoires de composés.

Les activités anti-inflammatoires du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et des quatre glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine ont été évaluées sur des cellules RAW 264.7. Les cellules ont été traitées avec du LPS et les composés pendant 24 h. Les concentrations des composés utilisées sont comprises entre 2,5 et 25  $\mu$ M pour le resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine, et entre 5 et 100  $\mu$ M pour les glucuronides.

### 2.1 Stratégie, matériel et méthode des expériences sur macrophages

#### 2.1.1 Entretien de la lignée cellulaire RAW 264.7

La lignée RAW 264.7 est une lignée de macrophages issue de souris, obtenue à la Collection Européenne de Cultures Cellulaires Authentiques (ATCC). Les cellules sontensemencées dans des flasks de 75 cm<sup>2</sup> ou 25 cm<sup>2</sup> dans un milieu constitué de DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin inactivé et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules sont incubées à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.1.2 Condition de culture des cellules

Pour toutes les expériences, les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 60 000 cellules / puits. Après 24 h de culture, les cellules sont traitées avec du LPS à 0,1 µg/mL et des différentes concentrations en VG1, VG2, VG3 et VG4 (n=4 puits pour chaque condition) préalablement dissous dans le DMSO à 40 mM. Le milieu de culture utilisé pour le traitement des cellules est le milieu RPMI blanc. Pour les dosages de viabilité cellulaire et de NO, la condition de référence (représentant le 100%) est la condition des cellules traitées uniquement avec le LPS. Chaque expérience a été réalisée au minimum 3 fois.

### 2.1.3 Mesure de la viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire se fait avec le MTT (3-[4,5-diméthylethiazol-2-yl] - 2,5-diphényl tetrazolium bromide). Ce composé est réduit en cristaux de formazan, non solubles et de couleur violette, par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Après dissolution des cristaux formés dans du DMSO, l'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Après traitement, le milieu de culture est enlevé, les cellules sont rincées avec 100µl de PBS puis incubées avec 0,5 mg/mL de MTT pendant 3 h à 37 °C. La solution de MTT est ensuite enlevée et les cristaux formés sont dissout dans du DMSO pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les absorbances à 595 nm sont ensuite mesurées avec un lecteur de plaque (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

### 2.1.4 Mesure de la production de NO

La production de NO dans le surnageant des cultures de cellules est mesurée par un test colorimétrique en utilisant le réactif de Griess. Ce réactif est composé de deux réactifs, l'α-naphtylamine et l'acide sulfanilique. Ce dernier, en présence de nitrites (forme stable du NO) forme un sel de diazonium qui réagit ensuite avec l'α-naphtylamine pour former un produit coloré quantifiable par spectrophotométrie. Une gamme étalon composée de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) est réalisée à des concentrations allant de 5 µM à 100µM. Pour chaque échantillon, 70 µL de surnageant sont prélevés et sont additionnés de 70 µL de réactif de Griess. Après 15 minutes à l'obscurité, l'absorbance est lue (540 nm) et la quantité de NO est déterminée pour chaque condition à partir de la gamme étalon.

### 2.1.5 Analyse des milieux de culture

Les milieux de cultures des macrophages sont récoltés après 24 h de contact avec VG1. Ils sont ensuite analysés en UPLC-DAD-MS avec une méthode de chromatographie liquide et les paramètres de masse (trappe ionique) préalablement établis [179] et en utilisant une UPLC Infinify 1290 (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France).

## 2.2 Effets anti-inflammatoires de l' $\epsilon$ -viniférine et ses glucuronides sur des macrophages en culture

### 2.2.1 Effets de du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine sur la viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité cellulaire permet de déterminer le seuil de toxicité des différents composés utilisés. Le composé est considéré comme étant toxique pour un seuil de viabilité inférieur à 70% (ISO 10993-5 :2009). Les dosages de viabilité cellulaire sont présentés en Figure 37.

Concernant l' $\epsilon$ -viniférine, une diminution brutale du pourcentage de viabilité est observée à partir de 25  $\mu$ M, alors que le resvératrol n'impacte pas la viabilité des cellules. Les 4 glucuronides ne semblent présenter aucune cytotoxicité sur macrophages aux concentrations testées.

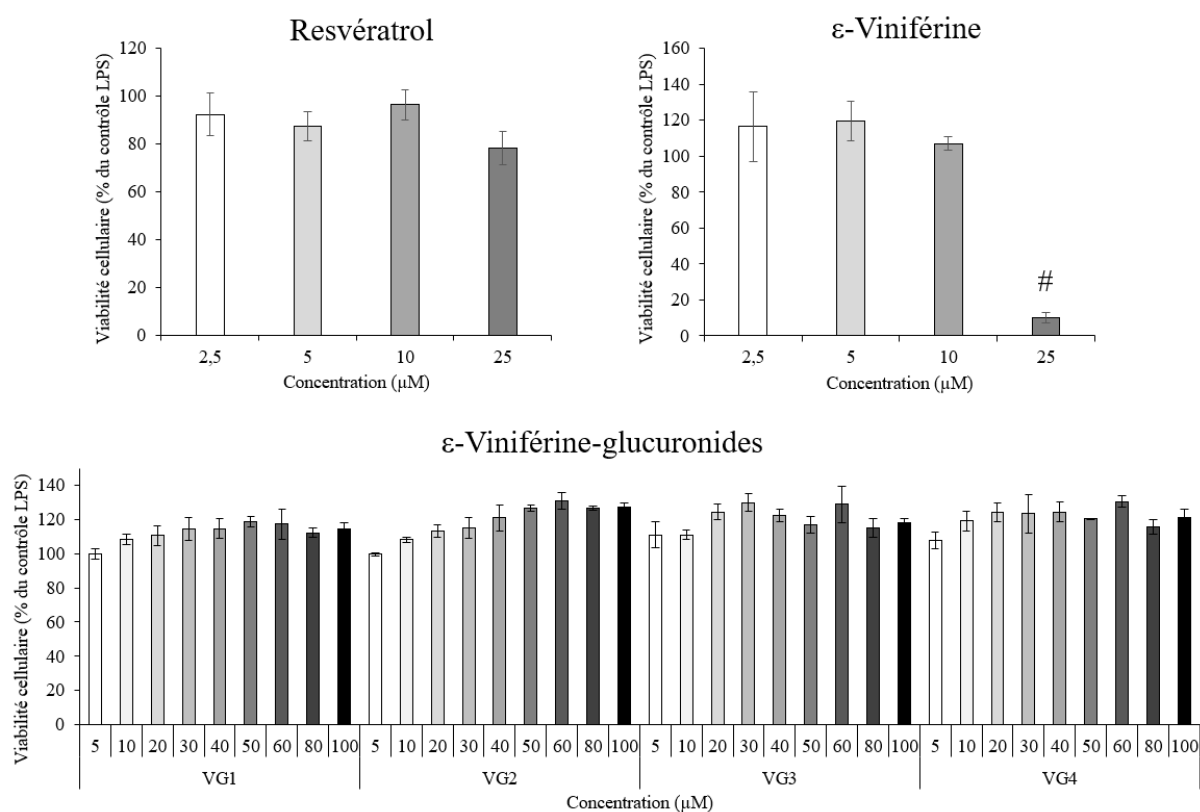


Figure 37. Viabilité cellulaire des macrophages après expositions à différentes concentrations de resvératrol,  $\epsilon$ -viniférine, VG1, VG2, VG3 et VG4. Les expériences ont été réalisées au minimum 3 fois. # : diminution de la viabilité cellulaire de plus de 30%.

### 2.2.2 Effet de ces composés sur la production de NO dans des macrophages activés

Nous observons dans les différentes expériences réalisées que les concentrations en NO dans les cellules non traitées est inférieure à 6  $\mu$ M, alors que celles des cellules mises en contact

avec le LPS sont comprises entre 25 et 35  $\mu$ M. L'ajout de LPS sur les macrophages induit donc une forte augmentation de la production de ce médiateur inflammatoire.

Le traitement avec l' $\epsilon$ -viniférine induit une diminution de la production de NO à 5 et 10  $\mu$ M par rapport aux cellules activées par le LPS. Au-delà de cette concentration, la molécule étant toxique, les résultats ne sont pas exploitables. Le resvératrol, quant à lui, induit une diminution de la production de NO de façon dose dépendante jusqu'à 25  $\mu$ M. La comparaison des IC<sub>50</sub> des deux molécules montre que l' $\epsilon$ -viniférine présente une meilleure activité anti-inflammatoire que le resvératrol (IC<sub>50</sub>  $\epsilon$ -viniférine = 8,5  $\mu$ M versus IC<sub>50</sub> resvératrol = 20,6  $\mu$ M).

L'ensemble des glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine montre des effets inhibiteurs sur la production de NO (Figure 38).

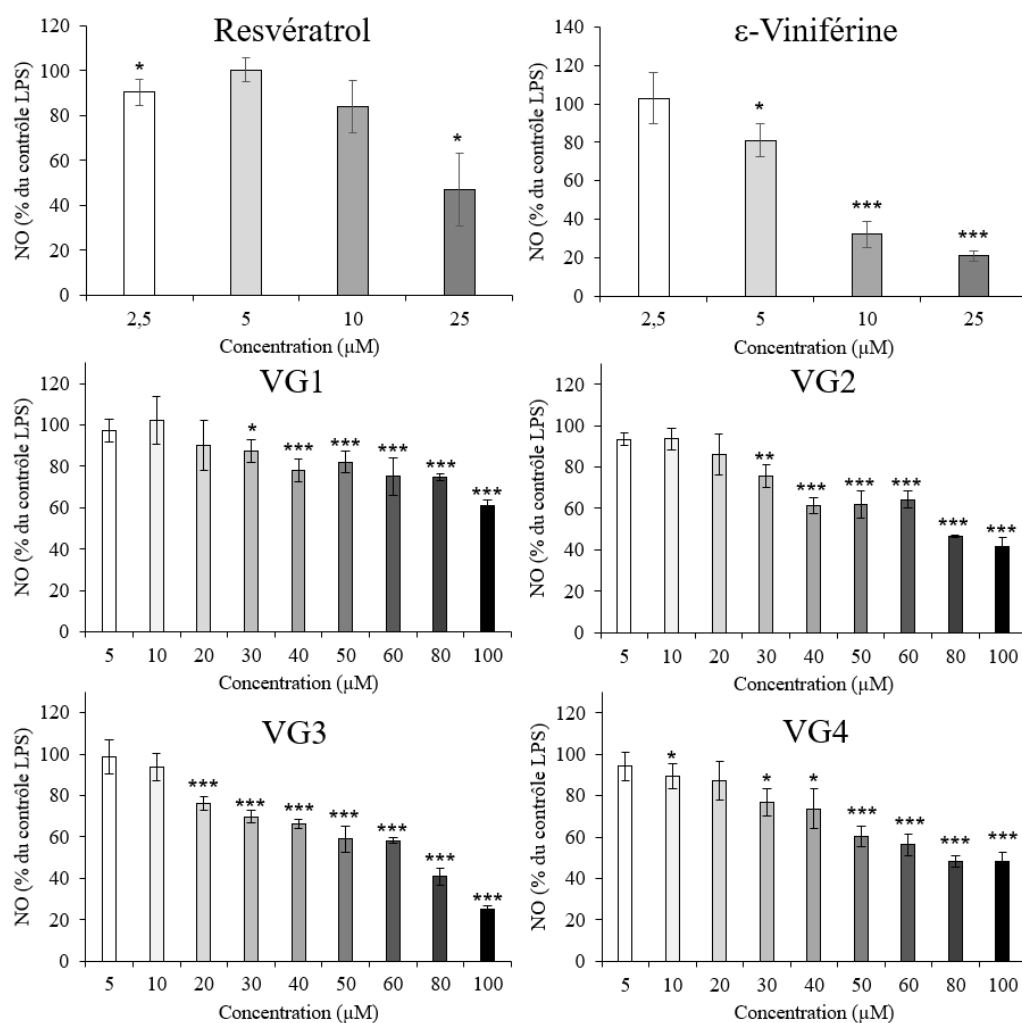


Figure 38. Production de NO dans les macrophages après induction aux LPS et exposition à différentes concentrations de VG1, VG2, VG3, VG4, resvératrol et  $\epsilon$ -viniférine. Les valeurs sont exprimées en % du contrôle stimulé aux LPS  $\pm$  SEM. # = significativement supérieur au contrôle LPS ( $p < 0.05$ ) ; \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.005$  ; \*\*\* :  $p < 0.0005$ . Les expériences ont été réalisées au minimum 3 fois.



En effet, nous observons une diminution dose-dépendante pour les concentrations utilisées (par rapport aux cellules activées par le LPS) à partir de la concentration 20  $\mu$ M pour VG3 et à partir de 30  $\mu$ M pour VG1, VG2 et VG4. En comparant les IC<sub>50</sub> des 4 glucuronides, de meilleurs effets ont été observés pour VG3 suivi de VG4 et VG2 avec des valeurs respectives de 69,4, 76,0 et 76,5  $\mu$ M. Concernant VG1, nous n'avons pas pu calculer son IC<sub>50</sub>, car à la plus forte concentration utilisée (100 $\mu$ M) l'inhibition est de 60 %.

### 2.2.3 Devenir d'un glucuronide de l' $\epsilon$ -viniférine, VG1, dans des macrophages en culture

Bien que cette expérience soit une expérience préliminaire (réalisée une seule fois et avec un n=1), nous avons pensé qu'il était intéressant de la présenter dans ce manuscrit. L'objectif est de suivre le devenir d'un glucuronide de l' $\epsilon$ -viniférine mis en contact de macrophages, activés ou non. Les cellules ont donc été traitées avec ou sans le LPS et en présence de VG1 à différentes concentrations (10, 15, 20, 40  $\mu$ M) pendant 24 h. A la fin du traitement, les milieux de culture ont été récoltés et analysés en UPLC-DAD-MS. Les quantités de VG1 et d' $\epsilon$ -viniférine dans les milieux de culture sont exprimés en  $\mu$ M (Figure 39, A), et la proportion d' $\epsilon$ -viniférine (par rapport à la quantité totale des 2 composés) apparaissant dans les milieux est exprimée en pourcentage (Figure 39, B).

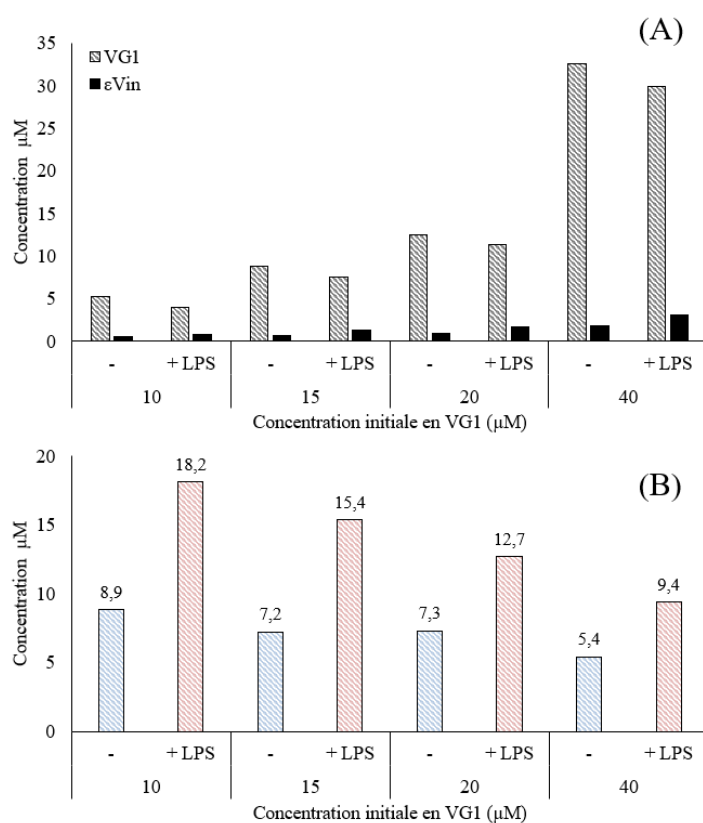


Figure 39. Dosage des milieux de culture des macrophages après exposition à différentes concentrations de VG1, avec ou sans stimulation de l'inflammation par les LPS. (A) : histogramme des concentrations en  $\epsilon$ -viniférine et VG1 quantifiées dans les milieux et (B)

Les résultats de ces dosages, montrent que dans tous les échantillons, nous observons l'apparition d' $\epsilon$ -viniférine dans les milieux de culture. Cependant, l'activation des macrophages par le LPS entraîne une augmentation des pourcentages d'apparition d' $\epsilon$ -viniférine. En effet, les pourcentages d' $\epsilon$ -viniférine sont 2 fois plus importants dans les cellules activées que dans les cellules en condition contrôle, et ce pour toutes les concentrations en VG1 utilisées. En revanche, nous observons également une diminution de ces pourcentages en fonctions des concentrations croissantes de VG1 mises en contact avec les cellules. Par exemple, l'exposition de 10  $\mu$ M de VG1 aux macrophages activés entraîne la formation de 18,2 % d' $\epsilon$ -viniférine, alors qu'à 40  $\mu$ M de VG1, ce pourcentage tend à diminuer pour atteindre 9,4 %.

### 2.3 Discussions sur les propriétés anti-inflammatoires des composés

Les résultats montrent que le resvératrol est moins toxique que l' $\epsilon$ -viniférine, cependant l' $\epsilon$ -viniférine s'avère être plus efficace pour inhiber la production d'un marqueur de l'inflammation. Ces résultats sont similaires de ceux qui ont été publiés récemment au laboratoire [278]. En effet, cette étude sur l'activité anti-inflammatoire de 20 stilbènes, réalisée sur des macrophages, montre une diminution de plus de 30% de la viabilité cellulaire au-delà de 50  $\mu$ M de resvératrol et de 19,1 et 18,3  $\mu$ M d' $\epsilon$ -viniférine (deux méthodes de mesure testées). Concernant l'inhibition de la production de NO, le resvératrol a un IC<sub>50</sub> de 28  $\mu$ M contre 15,6  $\mu$ M pour l' $\epsilon$ -viniférine. Nous obtenons donc les mêmes tendances, même si les valeurs sont différentes, ce qui pourrait être dû aux protocoles différents utilisés et aux variabilités dues à l'expérimentateur.

Ces résultats ont également mis en évidence que les glucuronides de l' $\epsilon$ -viniférine sont capables d'inhiber la production de NO dans des macrophages activés. Considérant les IC<sub>50</sub>, nous observons que les glucuronides sont moins actifs que l' $\epsilon$ -viniférine. Des résultats similaires sont obtenus par Walker *et al.* (2014), pour le resvératrol [279]. En effet, les métabolites du resvératrol tels que le resvératrol-3-sulfate, le resvératrol-disulfate, le resvératrol-3-glucuronide et le resvératrol-4'-glucuronide, induisent une diminution de la production de différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1a, IL-1b) par les macrophages U-937 activés par LPS. Cependant, dans la plupart des cas, ils sont moins actifs que le resvératrol [279].

Nous remarquons aussi que le glucuronide le plus présents dans la circulation systémique chez le rat après administration oral, VG1, est également celui qui présente la plus faible inhibition de production de NO sur le modèle *in vitro* de macrophages.

Les résultats de l'étude préliminaire sur le devenir d'un glucuronide de l' $\epsilon$ -viniférine, VG1, dans des macrophages met en évidence une apparition d' $\epsilon$ -viniférine dans les milieux de culture. Cette apparition pourrait certainement être due à la dé-glucuronidation de VG1 par des  $\beta$ -glucuronidases. En effet, des travaux portant sur l'inflammation chez la souris ayant reçu de la lutéoline montrent que l'activation de l'inflammation *in vivo* entraîne une augmentation du rapport forme aglycone/forme glucuronidée de la lutéoline [280]. De plus, une étude plus

récente a montré que les propriétés anti-inflammatoires de la génistéine glucuronidée étaient diminuées en présence d'inhibiteur de la β-glucuronidase [274].

Ainsi, la faible activité anti-inflammatoire de VG1 (comparée à celle de l'ε-viniférine), ainsi que sa potentielle déglucuronidation dans des macrophages activés, nous permettent de proposer une hypothèse sur le mécanisme d'action de l'ε-viniférine et de ses glucuronides *in vitro*. Nous supposons que l'activité inhibitrice des glucuronides sur la production du NO, pourraient être due, non pas aux glucuronides, mais plutôt à l'ε-viniférine produite sous l'action des β-glucuronidase. De ce fait, si les macrophages exposés à 40 μM de VG1 métabolisent 10% de ce composé, les cellules se retrouvent alors au contact de 4 μM d'ε-viniférine, qui est une quantité suffisante pour inhiber la production de NO.

## ***Conclusions générales du volume III***

Le volume III avait pour but de déterminer les potentielles propriétés biologiques des métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine. En effet, l'étude pharmacocinétique présentée en volume II a révélé une forte glucuronidation de la molécule après administration orale. L' $\epsilon$ -viniférine, ayant montré des propriétés biologiques *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse que les métabolites glucuronidés pouvaient être responsables de ces activités.

### **❖ Les glucuronides diminuent l'accumulation de TG dans un modèle *in vitro* de stéatose hépatique.**

L'utilisation de la lignée cellulaire AML-12 a permis de mimer un état stéatosique par induction de l'accumulation de lipides après exposition au PA. Les glucuronides semblent être plus efficaces que leur molécule native dans la diminution de l'accumulation des TG. Les mesures de l'expression des gènes par RT-PCR et des protéines par Western Blot impliqués dans le métabolisme des TG ont permis de mettre en évidence que cette action se faisait notamment en inhibant la lipogenèse *de novo*.

### **❖ L' $\epsilon$ -viniférine semble peu glucuronidée dans les hépatocytes en culture.**

Contrairement au resvératrol qui est totalement métabolisé en glucuronides, l' $\epsilon$ -viniférine est peu transformée dans la lignée cellulaire AML-12. Ainsi, ce modèle ne semble pas reproduire les résultats observés *in vivo*, à savoir une forte glucuronidation de l' $\epsilon$ -viniférine au niveau hépatique.

### **❖ La forme native présente des propriétés anti-inflammatoires plus importantes que les glucuronides.**

L'utilisation de LPS a permis d'activer les macrophages et d'augmenter la production de NO excrété dans le milieu de culture. Cette production a été diminuée par l' $\epsilon$ -viniférine, et dans une moindre mesure, par ses glucuronides. Cependant, il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces composés sur d'autres marqueurs de l'inflammation, comme TNF $\alpha$  ou IL1- $\beta$  (Interleukine 1  $\beta$ ).

### **❖ Les macrophages activés métabolisent VG1 en $\epsilon$ -viniférine**

Après exposition des formes glucuronidées aux macrophages activés, des formes aglycones ont été retrouvées. Ainsi, dans un contexte inflammatoire, les glucuronides clivés par les  $\beta$ -glucuronidases pourraient alors servir de réserve d' $\epsilon$ -viniférine, molécule plus active.

*Ces travaux ont mis en évidence que les composés peuvent subir un métabolisme lié à la pathologie étudiée. De plus, ces composés natifs ou métabolisés, peuvent présenter des activités différentes selon la pathologie ciblée : stéatose hépatique ou inflammation.*

## *Conclusion générale*

Ces travaux de thèse se sont focalisés sur l' $\epsilon$ -viniférine, la comparaison de sa pharmacocinétique lorsqu'elle est administrée sous forme libre ou sous une forme encapsulée chez l'animal, son métabolisme et ses activités biologiques.

La première partie de ces travaux de thèse, réalisée en collaboration avec le CBMN, a permis d'améliorer le taux d'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans des MLLs. De plus, une méthode de séparation de l' $\epsilon$ -viniférine non encapsulée, des MLLs contenant l' $\epsilon$ -viniférine, a été développée, permettant des mesures rapides du taux d'encapsulation.

Les MLLs, produits en grande quantité et caractérisés, ont alors été administrés par voie orale chez le rat. Nos résultats indiquent que l'encapsulation n'a pas d'impact significatif sur la pharmacocinétique de l' $\epsilon$ -viniférine, mais qu'elle permet de prolonger le temps d'exposition de l'organisme aux métabolites glucuronidés, dosés pour la première fois dans des échantillons biologiques après administration orale. Dans la mesure où ces métabolites présentent des activités biologiques intéressantes, l'encapsulation de l' $\epsilon$ -viniférine dans les MLLs permettrait, par conséquent, de prolonger la durée de son action.

Afin de mieux comprendre le devenir des MLLs dans l'organisme, des expériences complémentaires pourraient être réalisées. Par exemple, l'utilisation de milieux modèles gastriques et intestinaux pour mesurer la stabilité, de fractions intestinales pour mesurer le métabolisme ou encore de la lignée cellulaire Caco-2 pour mesurer l'absorption pourraient être envisagée. Ces expériences permettraient de mieux comprendre sous quelle forme, encapsulée ou non, la molécule atteint la circulation systémique, et l'impact de l'encapsulation sur le métabolisme.

Par ailleurs, le caractère amphiphile des bicouches phospholipidiques que composent les MLLs permet en théorie l'encapsulation de composés de degrés d'hydrophobicité différents. De ce fait, dans un contexte de valorisation de molécules naturelles, la co-encapsulation de plusieurs molécules ou l'encapsulation d'extraits de plantes pourraient être des pistes intéressantes dans le but de développer des ingrédients actifs.

L'étude *in vivo* nous a également permis de démontrer une forte glucuronidation de l' $\epsilon$ -viniférine après administration orale chez le rat. Les métabolites glucuronidés ont en effet été retrouvés dans le plasma mais également le foie et les reins, en large majorité. Cette forte glucuronidation témoigne de l'implication de l'intestin dans ce métabolisme.

L'analyse de l'évolution des concentrations plasmatiques au cours du temps nous a mené à émettre l'hypothèse d'une circulation entéro-hépatique des formes glucuronidées. Pour mieux comprendre la circulation des différentes formes de la molécule dans l'organisme, des analyses de la bile nous semblent être des perspectives envisageables et enrichissantes.

La présence largement majoritaire des formes glucuronidées dans le foie nous a poussé à étudier l'activité de ces glucuronides sur des hépatocytes accumulant de façon excessive des TG, dans un contexte de lutte contre le développement des NAFLD. En effet, l'hypothèse d'une potentielle activité des métabolites glucuronidés a découlé du constat que l'administration d' $\epsilon$ -viniférine induit une diminution des TG dans le foie dans une étude *in vivo*[275]. Nous avons, par le biais d'une collaboration avec l'Université du Pays Basque, entrepris des expériences sur un modèle *in vitro* de stéatose hépatique : les cellules AML-12 exposées au PA. Bien que les résultats nécessitent des analyses mécanistiques supplémentaires, il semblerait que VG1, le

glucuronide largement majoritaire *in vivo*, diminue l'accumulation des TG en agissant sur la lipogenèse *de novo*. Dans ces expériences, la forme aglycone, l' $\epsilon$ -viniférine, ne semble pas avoir d'activité, ce qui vient appuyer le fait que l'analyse des métabolites *in vivo* est une étape importante dans la compréhension des activités biologiques.

D'autres stilbènes (ptérostilbène et resvératrol [179,277]) présentent des activités similaires. Ces résultats permettent ainsi d'envisager des activités synergiques intéressantes entre les différents stilbènes que composent certains extraits végétaux déjà présents sur le marché des compléments alimentaires.

Par ailleurs, la quantification des métabolites et de la forme aglycone nous a apporté des résultats quelque peu inattendus, au niveau des tissus adipeux blancs. A l'inverse du foie et des reins, les tissus adipeux n'accumulent pas les composés dans des proportions identiques à celles de la circulation systémique. De plus, nous avons mis en évidence des différences entre les différents tissus adipeux blancs prélevés. Ainsi, le tissu adipeux sous-cutané contient majoritairement des formes glucuronidées, alors que le tissu mésentérique contient les formes glucuronidées et aglycones à parts égales. Ces résultats, bien que surprenants, sont en parfait accord avec une étude réalisée en 2013 sur des flavonoïdes [281]. Dans cette étude, réalisée chez le rat amaigri après administration par voie orale d'un extrait de procyanidines, les proportions des formes glucuronidées et des formes aglycones étaient identiques à celles de notre étude. Des études supplémentaires nous permettraient de comprendre les mécanismes de transports et de biotransformations qui entraînent ces différences d'accumulation. Le dosage des formes (aglycones ou métabolisées) dans la circulation lymphatique après administration orale nous permettrait de vérifier l'hypothèse d'un passage de l'intestin aux tissus adipeux par l'intermédiaire de la lymphe. *In vitro*, l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes du métabolisme, comme la  $\beta$ -glucuronidase, sur les lignées des différentes cellules constituant le tissu adipeux, pourraient permettre de mieux comprendre l'origine de la présence des formes aglycones dans ces tissus.

Nos résultats préliminaires sur macrophages activés, mimant l'inflammation, nous ont amené à nous intéresser à une autre variable impliquée dans le métabolisme : l'influence de l'état pathologique sur celui-ci. Dans l'étude réalisée par Ardévol *et al.* (2013), sur les procyanidines, les auteurs ont comparé deux groupes de rats ; l'un constitué de rats souffrant d'obésité et l'autre constitué de rats maigres. Les résultats de cette étude sont originaux dans la mesure où les rats souffrants d'obésité présentent un mésentère et un tissu sous-cutané contenant majoritairement les formes aglycones, quand les rats maigres accumulent les deux formes avec une prédominance pour les formes glucuronidées. Ainsi, l'état métabolique de l'animal (obésité) aura des conséquences sur le métabolisme des composés administrés.

Cette observation a également été faite dans le cadre d'une autre pathologie, le cancer colorectal. En effet, Patel *et al.*, en 2010, ont dosé le resvératrol et ses métabolites dans le plasma et des tissus colorectaux chez des patients atteints d'un cancer colorectal, ayant administré du resvératrol. Ils ont mis en évidence que les formes circulantes étaient principalement des métabolites, alors que le resvératrol était observé dans les tissus tumoraux et les tissus proches de la tumeur [282]. A nouveau, la pathologie entraîne une modification du métabolisme dans les tissus affectés.

Dans une moindre mesure, nos résultats préliminaires sur macrophages ont mis en évidence une dé-glucuronidation des métabolites dans un contexte inflammatoire. Ainsi, partant du postulat que les macrophages ont des activités métaboliques, un modèle de coculture macrophages / adipocytes, permettrait de mettre en lumière l'impact sur les adipocytes des molécules métabolisées dans un contexte d'inflammation.

*Les outils analytiques utilisés et développés durant ces travaux de thèse nous ont permis de quantifier spécifiquement les métabolites glucuronidés de l' $\epsilon$ -viniférine dans différents tissus chez le rat, après administration orale. Les résultats obtenus nous semblent importants. En effet, au-delà des variabilités inter-espèces à prendre en considération, des variabilités inter-individus et des variabilités entre les différents tissus, il semblerait que l'état pathologique ait également des répercussions importantes sur les profils métaboliques retrouvés. Partant de ce postulat, il nous semble important de souligner que lors de la mise en place d'études in vivo visant à mesurer les effets d'une molécule, les études analytiques des profils métaboliques des tissus cibles sont nécessaires pour déterminer les acteurs réellement responsables des propriétés biologiques.*



# Communications scientifiques

## Publications scientifiques

Medrano-Padial, C., Puerto, M., Prieto, A. I., Ayala, N., **Beaumont, P.**, Rouger, C., Krisa, S., & Pichardo, S. (2021). In Vivo Genotoxicity Evaluation of a Stilbene Extract Prior to Its Use as a Natural Additive: A Combination of the Micronucleus Test and the Comet Assay. *Foods*, 10(2), 439. <https://doi.org/10.3390/foods10020439>

**Beaumont, P.**, Courtois, A., Richard, T., Krisa, S., & Faure, C. (2021). Encapsulation of  $\epsilon$ -viniferin into multi-lamellar liposomes: Development of a rapid, easy and cost-efficient separation method to determine the encapsulation efficiency. *Pharmaceutics*, 13(4), NA. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040566>

**Beaumont, P.**, Courtois, A., Atgié, C., Richard, T., & Krisa, S. (2021). *In the shadow of resveratrol: biological activities of epsilon-viniferin*. [accepté avec révisions mineures]

**Beaumont, P.**, Faure, C., Courtois, A., Jourdes, M., Marchal, A., Teisse-5 Dre, P.-L., Richard, T., Atgié, C., & Krisa, S. (2021). Trans- $\epsilon$ -viniferin encapsulation in multi-lamellar liposomes : 2 consequences on pharmacological parameters, biodistribution 3 and glucuronide formation in rats 4. *Nutrients*, 13. <https://doi.org/10.3390/xxxxx> [soumis]

## Communications orales

**Beaumont P.** « Phase II viniferin metabolites: hemisynthesis and quantification of glucuronides forms in rat plasma after oral administration ». **Metaboday**, Mars 2021 (en ligne).

**Beaumont P.** « Bioavailability of a resveratrol dimer,  $\epsilon$ -viniferin: from the demonstration of strong glucuronidation to biological tests ». **Workshop Euskampus: Stilbenes, bioactive molecules with interest for health. New opportunities for nutraceutical and food industry**. Juillet 2021 (en ligne).

**Beaumont P.** « Métabolisme de l'épsilon-viniférine après administration orale chez le rat ; et potentielles activités biologiques des métabolites glucuronidés ». Assemblée générale de l'association **Nutrition Méditerranéenne et Santé**. Octobre 2021 (en ligne).

## Communications par affiche

**Beaumont P**, Atgié C, Courtois A, Krisa S, Faure C. « Encapsulation of *trans*- $\epsilon$ -viniferin in multi-lamellar liposomes. », 2e **Symposium franco-indien entre Bordeaux et Hyderabad: Plants with Health Benefits and Biomolecules of Interest**. Novembre 2019.

**Beaumont P**, Courtois A, Atgié C, Jourdes M, Marchal A, Faure C, Richard T and Krisa S. « Quantification of *trans*- $\epsilon$ -viniferin and its glucuro-conjugated metabolites in rat plasma after oral administration », **XXX International Conference on Polyphenols**. Juillet 2021 (en ligne).

## Prix & Bourses

**Beaumont P**, Portillo MP, Jourdes M, Courtois A, Krisa S. « In vitro anti-adipogenic activities of  $\epsilon$ -viniferin metabolites». Conference on Trans-Pyreanean Investigations in Obesity and Diabetes. **1st Basic Research prize**.

**Beaumont P**, Courtois A, Atgié C, Jourdes M, Marchal A, Faure C, Richard T and Krisa S. « Quantification of *trans*- $\epsilon$ -viniferin and its glucuro-conjugated metabolites in rat plasma after oral administration», XXX International Conference on Polyphenols. **Prix du meilleur poster dans la catégorie « Bioactivity & Bioavailability »**.

« Effets anti-adipogéniques des stilbènes de la vigne ». **Bourse de mobilité** de l'association Nutrition Méditerranéenne et Santé.

Appel à candidatures « Mobilité, internationalisation des études doctorales 2020. **Financement d'une mobilité internationale**, initiative d'excellence de l'Université de Bordeaux

# Références

1. Gabaston, J. *Stilbènes de La Vigne et d'essences Forestières (Pin, Épicéa) : Etude Phytochimique et Recherche d'activités Anti-Oomycète et Insecticide*;
2. Tohge, T.; Watanabe, M.; Hoefgen, R.; Fernie, A.R. Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science* **2013**, *4*, doi:10.3389/FPLS.2013.00062.
3. Vogt, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **2010**, *3*, 2–20, doi:10.1093/MP/SSP106.
4. Gabaston, J. *Stilbènes de La Vigne et d'essences Forestières (Pin, Épicéa) : Etude Phytochimique et Recherche d'activités Anti-Oomycète et Insecticide*. <http://www.theses.fr> **2018**.
5. Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.; Palazón, J. Phenolic Acids. In *Natural Products*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 1951–1973.
6. Satake, H.; Koyama, T.; Bahabadi, S.; Matsumoto, E.; Ono, E.; Murata, J. Essences in Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis. *Metabolites* **2015**, *5*, 270–290, doi:10.3390/metabo5020270.
7. Database on Polyphenol Content in Foods - Phenol-Explorer Available online: <http://phenol-explorer.eu/> (accessed on 24 October 2021).
8. Santos, E.L.; Maia, B.H.L.N.S.; Teixeira, A.P.F. and S.D. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* **2017**, doi:10.5772/67861.
9. Langcake, P.; Pryce, R.J. A New Class of Phytoalexins from Grapevines. *Experientia* **1977**, *33*, 151–152, doi:10.1007/BF02124034.
10. Gabaston, J.; Cantos-Villar, E.; Biais, B.; Waffo-Teguo, P.; Renouf, E.; Corio-Costet, M.-F.; Richard, T.; Mérillon, J.-M. Stilbenes from *Vitis Vinifera* L. Waste: A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara Viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 2711–2718, doi:10.1021/acs.jafc.7b00241.
11. Montibus, M.; Vitrac, X.; Coma, V.; Loron, A.; Pinson-Gadais, L.; Ferrer, N.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Gabaston, J.; Waffo-Tégou, P.; Richard-Forget, F.; et al. Screening of Wood/Forest and Vine By-Products as Sources of New Drugs for Sustainable Strategies to Control *Fusarium Graminearum* and the Production of Mycotoxins. *Molecules* **2021**, *Vol. 26, Page 405* **2021**, *26*, 405, doi:10.3390/MOLECULES26020405.
12. Khawand, T. el Extraction et Hémisynthèse de Stilbènes de La Vigne et Du Vin Pour Une Application En Santé Humaine et Végétale. <http://www.theses.fr> **2019**.
13. Sobolev, V.; Arias, R.; Goodman, K.; Walk, T.; Orner, V.; Faustinelli, P.; Massa, A. Suppression of Aflatoxin Production in *Aspergillus* Species by Selected Peanut ( *Arachis Hypogaea* ) Stilbenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66*, 118–126, doi:10.1021/acs.jafc.7b04542.
14. Maddox, C.E.; Laur, L.M.; Tian, L. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella Fastidiosa*. *Current Microbiology* **2010**, *60*, 53, doi:10.1007/S00284-009-9501-0.
15. Gabaston, J.; el Khawand, T.; Waffo-Teguo, P.; Decendit, A.; Richard, T.; Mérillon, J.-M.; Pavela, R. Stilbenes from Grapevine Root: A Promising Natural Insecticide against *Leptinotarsa Decemlineata*. *Journal of Pest Science* **2018**, *91*, 897–906, doi:10.1007/S10340-018-0956-2.
16. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **2009**, *56*, 317–333, doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.

17. Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* **2007**, *8*, 950.
18. Arfaoui, L. Dietary Plant Polyphenols: Effects of Food Processing on Their Content and Bioavailability. *Molecules* **2021**, *Vol. 26*, Page 2959 **2021**, *26*, 2959, doi:10.3390/MOLECULES26102959.
19. Crovesy, L.; Kaippert, V.C.; Lopes, M.C.O. dos S.; Magno, F.C.C.M.; Fialho, E.; Rosado, E.L. Profile of Polyphenol Intake by Women with Different Classes of Obesity: Consumption of These Compounds Does Not Reflect Healthy Eating. *Nutrition* **2021**, *82*, 111045, doi:10.1016/j.nut.2020.111045.
20. Brat, P.; Georgé, S.; Bellamy, A.; Chaffaut, L. du; Scalbert, A.; Mennen, L.; Arnault, N.; Amiot, M.J. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *The Journal of Nutrition* **2006**, *136*, 2368–2373, doi:10.1093/jn/136.9.2368.
21. Pérez-Jiménez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. Dietary Intake of 337 Polyphenols in French Adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2011**, *93*, 1220–1228, doi:10.3945/ajcn.110.007096.
22. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Luján-Barroso, L.; Romieu, I.; Scalbert, A.; Slimani, N.; Hjartåker, A.; Engeset, D.; Skeie, G.; Overvad, K.; et al. Differences in Dietary Intakes, Food Sources and Determinants of Total Flavonoids between Mediterranean and Non-Mediterranean Countries Participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *British Journal of Nutrition* **2013**, *109*, 1498–1507, doi:10.1017/S0007114512003273.
23. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hémon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyrø, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.-C.; et al. Dietary Polyphenol Intake in Europe: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *European Journal of Nutrition* **2015**, *55*, 1359–1375, doi:10.1007/S00394-015-0950-X.
24. Chastang, T. *Etude de La Synthèse Du Resvératrol et de Ses Dérivés (Viniférines) Par Des Suspensions de Cellules de Vigne et Optimisation de La Production En Bioréacteur*;
25. Li, C.; Xu, X.; Tao, Z.; Wang, X.J.; Pan, Y. Resveratrol Dimers, Nutritional Components in Grape Wine, Are Selective ROS Scavengers and Weak Nrf2 Activators. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 218–223, doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.165.
26. Shen, T.; Xie, C.-F.; Wang, X.-N.; Lou, H.-X. Stilbenoids. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* **2013**, 1901–1949, doi:10.1007/978-3-642-22144-6\_63.
27. Keylor, M.H.; Matsuura, B.S.; Stephenson, C.R.J. Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. **2015**, doi:10.1021/cr500689b.
28. Takaoka, M. The Phenolic Substances of White Hellebore (*Veratrum Grandiflorum* Hoes. Fil). IV. *NIPPON KAGAKU KAISHI* **1940**, *61*, 96–98, doi:10.1246/NIKKASHI1921.61.96.
29. Rivière, C.; Pawlus, A.D.; Mérillon, J.M. Natural Stilbenoids: Distribution in the Plant Kingdom and Chemotaxonomic Interest in Vitaceae. *Natural Product Reports* **2012**, *29*, 1317–1333.
30. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Waffo-Teguo, P.; Valls, J.; Palos Pinto, A.; Richard, T.; Cluzet, S.; Mérillon, J.M. Wood and Roots of Major Grapevine Cultivars and Rootstocks: A Comparative Analysis of Stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30*, 320–331, doi:10.1002/pca.2815.
31. Gabaston, J.; Valls Fonayet, J.; Franc, C.; Waffo-Teguo, P.; De Revel, G.; Hilbert, G.; Gomès, E.; Richard, T.; Mérillon, J.M. Characterization of Stilbene Composition in Grape Berries from Wild *Vitis* Species in Year-To-Year Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 13408–13417, doi:10.1021/acs.jafc.0c04907.
32. Loupit, G.; Prigent, S.; Franc, C.; De Revel, G.; Richard, T.; Cookson, S.J.; Fonayet, J.V. Polyphenol Profiles of Just Pruned Grapevine Canes from Wild *Vitis* Accessions and *Vitis*

- Vinifera Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 13397–13407, doi:10.1021/acs.jafc.9b08099.
33. Khawand, T. el; Courtois, A.; Valls, J.; Richard, T.; Krisa, S. A Review of Dietary Stilbenes: Sources and Bioavailability. *Phytochemistry Reviews* **2018**, *17*, 1007–1029, doi:10.1007/S11101-018-9578-9.
  34. Sebastià, N.; Soriano, J.M.; Pérez-Bermúdez, P. *Resveratrol in Berries: A Review Observatory of Nutrition and Food Safety View Project Health Physics View Project*;
  35. Kumšta, M.; Pavloušek, P.; Kupsa, J. Influence of Terroir on the Concentration of Selected Stilbenes in Wines of the Cv. Riesling in the Czech Republic. *Horticultural Science* **2012**, *39*, 38–46, doi:10.17221/126/2010-HORTSCI.
  36. Bavaresco, L. Role of Viticultural Factors on Stilbene Concentrations of Grapes and Wine. *Drugs Under Experimental and Clinical Research* **2003**, *29*, 181–187.
  37. Ribeiro de Lima, M.T.; Waffo-Téguo, P.; Teissedre, P.L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J.C.; Mérillon, J.M. Determination of Stilbenes ( *Trans* -Astringin, *Cis* - and *Trans* -Piceid, and *Cis* - and *Trans* -Resveratrol) in Portuguese Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2666–2670, doi:10.1021/jf9900884.
  38. Benbougerra, N.; Hornedo-Ortega, R.; Garcia, F.; el Khawand, T.; Saucier, C.; Richard, T. Stilbenes in Grape Berries and Wine and Their Potential Role as Anti-Obesity Agents: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *112*, 362–381, doi:10.1016/J.TIFS.2021.03.060.
  39. Arraki, K.; Renouf, É.; Waffo-Téguo, P.; Mérillon, J.-M.; Richard, T.; Decendit, A. Identification and Quantification of Stilbenes in Some Tunisian Red Wines Using UPLC-MS and HPLC-DAD. *OENO One* **2017**, *51*, 231–236, doi:10.20870/OENO-ONE.2017.51.2.1673.
  40. Guerrero, R.F.; Valls-Fonayet, J.; Richard, T.; Cantos-Villar, E. A Rapid Quantification of Stilbene Content in Wine by Ultra-High Pressure Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Food Control* **2020**, *108*, doi:10.1016/J.FOODCONT.2019.106821.
  41. Li, G.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Lang, J.; Chen, Y.; Ling, W. Estimated Daily Flavonoid and Stilbene Intake from Fruits, Vegetables, and Nuts and Associations with Lipid Profiles in Chinese Adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **2013**, *113*, 786–794, doi:10.1016/j.jand.2013.01.018.
  42. Rabassa, M.; Zamora-Ros, R.; Urpi-Sarda, M.; Bandinelli, S.; Ferrucci, L.; Andres-Lacueva, C.; Cherubini, A. Association of Habitual Dietary Resveratrol Exposure with the Development of Frailty in Older Age: The Invecchiare in Chianti Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2015**, *102*, 1534–1542, doi:10.3945/ajcn.115.118976.
  43. Zamora-Ros, R.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M.; Berenguer, T.; Jakszyn, P.; Martínez, C.; Sánchez, M.J.; Navarro, C.; Chirlaque, M.D.; Tormo, M.J.; et al. Concentrations of Resveratrol and Derivatives in Foods and Estimation of Dietary Intake in a Spanish Population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain Cohort. *British Journal of Nutrition* **2008**, *100*, 188–196, doi:10.1017/S0007114507882997.
  44. Abarca-Gómez, L.; Abdeen, Z.A.; Hamid, Z.A.; Abu-Rmeileh, N.M.; Acosta-Cazares, B.; Acuin, C.; Adams, R.J.; Aekplakorn, W.; Afsana, K.; Aguilar-Salinas, C.A.; et al. Worldwide Trends in Body-Mass Index, Underweight, Overweight, and Obesity from 1975 to 2016: A Pooled Analysis of 2416 Population-Based Measurement Studies in 128.9 Million Children, Adolescents, and Adults. *The Lancet* **2017**, *390*, 2627–2642, doi:10.1016/S0140-6736(17)32129-3.
  45. *DIRECTIVE 2002/46/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 10 June 2002 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Food Supplements (Text with EEA Relevance)*;
  46. Article 6 - Décret N°2006-352 Du 20 Mars 2006 Relatif Aux Compléments Alimentaires. - Légifrance Available online:

- [https://www.legifrance.gouv.fr/loda/article\\_lc/LEGIARTI000023875798](https://www.legifrance.gouv.fr/loda/article_lc/LEGIARTI000023875798) (accessed on 24 October 2021).
47. Arrêté Du 14 Juin 2006 Relatif Aux Modalités de Transmission Des Déclarations de Première Mise Sur Le Marché Des Compléments Alimentaires - Légifrance Available online: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000789486> (accessed on 24 October 2021).
  48. *COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2017/ 2470 - of 20 December 2017 - Establishing the Union List of Novel Foods in Accordance with Regulation (EU) 2015/ 2283 of the European Parliament and of the Council on Novel Foods*;
  49. Article 15 - Décret N°2006-352 Du 20 Mars 2006 Relatif Aux Compléments Alimentaires. - Légifrance Available online: [https://www.legifrance.gouv.fr/loda/article\\_lc/LEGIARTI000006290537](https://www.legifrance.gouv.fr/loda/article_lc/LEGIARTI000006290537) (accessed on 24 October 2021).
  50. Téléprocédure de Déclaration Des Compléments Alimentaires - Authentification Available online: <https://teleicare.dgccrf.finances.gouv.fr/> (accessed on 24 October 2021).
  51. Home - ClinicalTrials.Gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/> (accessed on 25 October 2021).
  52. Tomé-Carneiro, J.; González, M.; Larrosa, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; García-Almagro, F.J.; Ruiz-Ros, J.A.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F.A.; Espín, J.C. One-Year Consumption of a Grape Nutraceutical Containing Resveratrol Improves the Inflammatory and Fibrinolytic Status of Patients in Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology* **2012**, *110*, 356–363, doi:10.1016/j.amjcard.2012.03.030.
  53. Puglisi, M.J.; Vaishnav, U.; Shrestha, S.; Torres-Gonzalez, M.; Wood, R.J.; Volek, J.S.; Fernandez, M.L. Raisins and Additional Walking Have Distinct Effects on Plasma Lipids and Inflammatory Cytokines. *Lipids in Health and Disease* **2008**, *7*, 14, doi:10.1186/1476-511X-7-14.
  54. Parandoosh, M.; Yousefi, R.; Khorsandi, H.; Nikpayam, O.; Saidpour, A.; Babaei, H. The Effects of Grape Seed Extract ( *Vitis Vinifera* ) Supplement on Inflammatory Markers, Neuropeptide Y, Anthropometric Measures, and Appetite in Obese or Overweight Individuals: A Randomized Clinical Trial. *Phytotherapy Research* **2020**, *34*, 379–387, doi:10.1002/ptr.6529.
  55. Khoshbaten, M.; Aliasgarzadeh, A.; Masnadi, K.; Farhang, S.; Tarzamani, M.K.; Babaei, H.; Kiani, J.; Zaare, M.; Najafipoor, F. Grape Seed Extract to Improve Liver Function in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Change. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association* **2010**, *16*, 194–7, doi:10.4103/1319-3767.65197.
  56. Helander, H.F.; Fändriks, L. Surface Area of the Digestive Tract – Revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **2014**, *49*, 681–689, doi:10.3109/00365521.2014.898326.
  57. Histo-Diderot: Histologie Du Tube Digestif Available online: <http://moodle.sorbonne-paris-cite.fr/mod/page/view.php?id=1339> (accessed on 30 October 2021).
  58. Planas, J.M.; Alfaras, I.; Colom, H.; Juan, M.E. The Bioavailability and Distribution of Trans-Resveratrol Are Constrained by ABC Transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2012**, *527*, 67–73, doi:10.1016/j.abb.2012.06.004.
  59. Lafay, S. Biodisponibilité et Effet Antioxydant Des Acides Phénoliques Du Café. <http://www.theses.fr> **2005**.
  60. Kolars, J.C.; Lown, K.S.; Schmiedlin-Ren, P.; Ghosh, M.; Fang, C.; Wrighton, S.A.; Merion, R.M.; Watkins, P.B. CYP3A Gene Expression in Human Gut Epithelium. *Pharmacogenetics* **1994**, *4*, 247–259, doi:10.1097/00008571-199410000-00003.

61. Lévesque, É.; Hum, D.; Bélanger, A. Rôle Des UDP-Glucuronosyltransférases (UGT) Dans Le Métabolisme Des Hormones Stéroïdiennes. *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974]*, 2001, Vol. 17, N° 1; p.33-43 **2001**, 17, 33–43, doi:10.4267/10608/1785.
62. Jančová, P.; Šiller, M. Phase II Drug Metabolism. *Topics on Drug Metabolism* **2012**, doi:10.5772/29996.
63. ROBINSON, A.; HUTTLEY, G.A.; BOOTH, H.S.; BOARD, P.G. Modelling and Bioinformatics Studies of the Human Kappa-Class Glutathione Transferase Predict a Novel Third Glutathione Transferase Family with Similarity to Prokaryotic 2-Hydroxychromene-2-Carboxylate Isomerases. *Biochemical Journal* **2004**, 379, 541–552, doi:10.1042/bj20031656.
64. Hayes, J.D.; Strange, R.C. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology* **2000**, 61, 154–166, doi:10.1159/000028396.
65. Morel, F.; Rauch, C.; Petit, E.; Piton, A.; Theret, N.; Coles, B.; Guillouzo, A. Gene and Protein Characterization of the Human Glutathione S-Transferase Kappa and Evidence for a Peroxisomal Localization. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 16246–16253, doi:10.1074/jbc.M313357200.
66. Tamási, V.; Vereczkey, L.; Falus, A.; Monostory, K. Some Aspects of Interindividual Variations in the Metabolism of Xenobiotics. *Inflammation Research* **2003**, 52, 322–333, doi:10.1007/S00011-003-1186-4.
67. Zhou, S.F.; Liu, J.P.; Chowbay, B. Polymorphism of Human Cytochrome P450 Enzymes and Its Clinical Impact. *Drug Metabolism Reviews* **2009**, 41, 89–295, doi:10.1080/03602530902843483.
68. Watkins, P.B.; Wrighton, S.A.; Schuetz, E.G.; Molowa, D.T.; Guzelian, P.S. Identification of Glucocorticoid-Inducible Cytochromes P-450 in the Intestinal Mucosa of Rats and Man. *Journal of Clinical Investigation* **1987**, 80, 1029, doi:10.1172/JCI113156.
69. du Toit, A. Establishing the Gut Microbiota after Birth. *Nature Reviews Microbiology* 2019 17:11 **2019**, 17, 647–647, doi:10.1038/s41579-019-0276-4.
70. Cani, P.D.; Jordan, B.F. Gut Microbiota-Mediated Inflammation in Obesity: A Link with Gastrointestinal Cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2018**, 15, 671–682, doi:10.1038/s41575-018-0025-6.
71. Lea, T. Caco-2 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* **2015**, 103–111, doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_10.
72. Henry, C.; Vitrac, X.; Decendit, A.; Ennamany, R.; Krisa, S.; Mérillon, J.M. Cellular Uptake and Efflux of Trans-Piceid and Its Aglycone Trans-Resveratrol on the Apical Membrane of Human Intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 798–803, doi:10.1021/jf048909e.
73. Henry-Vitrac, C.; Desmoulière, A.; Girard, D.; Mérillon, J.M.; Krisa, S. Transport, Deglycosylation, and Metabolism of Trans-Piceid by Small Intestinal Epithelial Cells. *European Journal of Nutrition* **2006**, 45, 376–382, doi:10.1007/s00394-006-0609-8.
74. Maier-Salamon, A.; Hagenauer, B.; Wirth, M.; Gabor, F.; Szekeres, T.; Jäger, W. Increased Transport of Resveratrol across Monolayers of the Human Intestinal Caco-2 Cells Is Mediated by Inhibition and Saturation of Metabolites. *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, 2107–2115, doi:10.1007/s11095-006-9060-z.
75. Sabolovic, N.; Humbert, A.C.; Radominska-Pandya, A.; Magdalou, J. Resveratrol Is Efficiently Glucuronidated by UDP-Glucuronosyltransferases in the Human Gastrointestinal Tract and in Caco-2 Cells. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **2006**, 27, 181–189, doi:10.1002/BDD.498.
76. Kaldas, M.I.; Walle, U.K.; Walle, T. Resveratrol Transport and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, 55, 307–312, doi:10.1211/002235702612.

77. Kuhnle, G.; Spencer, J.P.E.; Chowrimootoo, G.; Schroeter, H.; Debnam, E.S.; Kaila, S.; Srail, S.; Rice-Evans, C.; Hahn, U. Resveratrol Is Absorbed in the Small Intestine as Resveratrol Glucuronide. **2000**, doi:10.1006/bbrc.2000.2750.
78. Liu, Q.; Chen, J.; Qin, Y.; Jiang, B.; Zhang, T. Encapsulation of Pterostilbene in Nanoemulsions: Influence of Lipid Composition on Physical Stability, In Vitro Digestion, Bioaccessibility, and Caco-2 Cell Monolayer Permeability. *Food and Function* **2019**, *10*, 6604–6614, doi:10.1039/C9FO01260E.
79. Sun, Y.; Xia, Z.; Zheng, J.; Qiu, P.; Zhang, L.; McClements, D.J.; Xiao, H. Nanoemulsion-Based Delivery Systems for Nutraceuticals: Influence of Carrier Oil Type on Bioavailability of Pterostilbene. *Journal of Functional Foods* **2015**, *13*, 61–70, doi:10.1016/j.jff.2014.12.030.
80. Jarosova, V.; Vesely, O.; Doskocil, I.; Tomisova, K.; Marsik, P.; Jaimés, J.D.; Smejkal, K.; Kloucek, P.; Havlik, J. Metabolism of Cis- and Trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients* **2020**, *Vol. 12*, Page 595 **2020**, *12*, 595, doi:10.3390/NU12030595.
81. Sangsen, Y.; Wiwattanawongsa, K.; Likhitwitayawuid, K.; Sritularak, B.; Graidist, P.; Wiwattanapatapee, R. Influence of Surfactants in Self-Microemulsifying Formulations on Enhancing Oral Bioavailability of Oxyresveratrol: Studies in Caco-2 Cells and in Vivo. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, *498*, 294–303, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.002.
82. Mei, M.; Ruan, J.Q.; Wu, W.J.; Zhou, R.N.; Lei, P.C.; Zhao, H.Y.; Yan, R.; Wang, Y.T. In Vitro Pharmacokinetic Characterization of Mulberroside A, the Main Polyhydroxylated Stilbene in Mulberry (*Morus Alba L.*), and Its Bacterial Metabolite Oxyresveratrol in Traditional Oral Use. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 2299–2308, doi:10.1021/jf204495t.
83. Willenberg, I.; Michael, M.; Wonik, J.; Bartel, L.C.; Empl, M.T.; Schebb, N.H. Investigation of the Absorption of Resveratrol Oligomers in the Caco-2 Cellular Model of Intestinal Absorption. *Food Chemistry* **2015**, *167*, 245–250, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.103.
84. de Santi, C.; Pietrabissa, A.; Spisni, R.; Mosca, F.; Pacifici, G.M. Sulphation of Resveratrol, a Natural Product Present in Grapes and Wine, in the Human Liver and Duodenum. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 609–617, doi:10.1080/004982500406435.
85. Aumont, V.; Krisa, S.; Richard, T.; Mérillon, J.M.; Battaglia, E.; Netter, P.; Magdalou, J.; Sabolovic, N. Regioselective and Stereospecific Glucuronidation of Trans- and Cis-Resveratrol in Human. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *393*, 281–289, doi:10.1006/ABBI.2001.2496.
86. Brill, S.S.; Furimsky, A.M.; Ho, M.N.; Furniss, M.J.; Li, Y.; Green, A.G.; Green, C.E.; Iyer, L. V.; Bradford, W.W.; Kapetanovic, I.M. Glucuronidation of Trans -Resveratrol by Human Liver and Intestinal Microsomes and UGT Isoforms . *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *58*, 469–479, doi:10.1211/jpp.58.4.0006.
87. Piver, B.; Fer, M.; Vitrac, X.; Merillon, J.M.; Dreano, Y.; Berthou, F.; Lucas, D. Involvement of Cytochrome P450 1A2 in the Biotransformation of Trans-Resveratrol in Human Liver Microsomes. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68*, 773–782, doi:10.1016/J.BCP.2004.05.008.
88. Maier-Salamon, A.; Böhmdrfer, M.; Thalhammer, T.; Szekeres, T.; Jaeger, W. Hepatic Glucuronidation of Resveratrol: Interspecies Comparison of Enzyme Kinetic Profiles in Human, Mouse, Rat, and Dog. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2011**, *26*, 364–373, doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-006.
89. Lançon, A.; Delma, D.; Osman, H.; Thénot, J.P.; Jannin, B.; Latruffe, N. Human Hepatic Cell Uptake of Resveratrol: Involvement of Both Passive Diffusion and Carrier-Mediated Process. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *316*, 1132–1137, doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.164.
90. Trepiana, J.; Krisa, S.; Renouf, E.; Portillo, M.P. Resveratrol Metabolites Are Able to Reduce Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 1–17, doi:10.3390/PH13100285.



91. Henry-Vitrac, C.; Richard, T.; Desmoulière, A.; Monti, J.R.; Mérillon, J.M.; Krisa, S. In Vitro Glucuronidation of Trans-Piceid and Trans-Piceatannol by Human Liver Microsomes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2008**, *42*, 241–243, doi:10.20870/oenone.2008.42.4.812.
92. Miksits, M.; Maier-Salamon, A.; Nha Vo, T.P.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Szekeres, T.; Jäger, W. Glucuronidation of Piceatannol by Human Liver Microsomes: Major Role of UGT1A1, UGT1A8 and UGT1A10. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 47–54, doi:10.1211/jpp.62.01.0004.
93. Miksits, M.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Szekeres, T.; Jäger, W. In-Vitro Sulfation of Piceatannol by Human Liver Cytosol and Recombinant Sulfotransferases. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *61*, 185–191, doi:10.1211/jpp/61.02.0007.
94. Dai, Y.; Lim, J.X.; Yeo, S.C.M.; Xiang, X.; Tan, K.S.; Fu, J.H.; Huang, L.; Lin, H.S. Biotransformation of Piceatannol, a Dietary Resveratrol Derivative: Promises to Human Health. *Molecular Nutrition and Food Research* **2020**, *64*, doi:10.1002/MNFR.201900905.
95. Etxeberria, U.; Fernández-Quintela, A.; Milagro, F.I.; Aguirre, L.; Martínez, J.A.; Portillo, M.P. Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 9517–9533.
96. Cardona, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Queipo-Ortuño, M.I. Benefits of Polyphenols on Gut Microbiota and Implications in Human Health. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2013**, *24*, 1415–1422.
97. Queipo-Ortuño, M.I.; Boto-Ordóñez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J.M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R.; Cardona Diaz, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tinahones, F.J. Influence of Red Wine Polyphenols and Ethanol on the Gut Microbiota Ecology and Biochemical Biomarkers. *American Journal of Clinical Nutrition* **2012**, *95*, 1323–1334, doi:10.3945/ajcn.111.027847.
98. Larrosa, M.; Yañez-Gascón, M.J.; Selma, M.V.; González-Sarrías, A.; Toti, S.; Cerón, J.J.; Tomás-Barberán, F.; Dolará, P.; Espín, J.C. Effect of a Low Dose of Dietary Resveratrol on Colon Microbiota, Inflammation and Tissue Damage in a DSS-Induced Colitis Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2211–2220, doi:10.1021/jf803638d.
99. Qiao, Y.; Sun, J.; Xia, S.; Tang, X.; Shi, Y.; Le, G. Effects of Resveratrol on Gut Microbiota and Fat Storage in a Mouse Model with High-Fat-Induced Obesity. **2014**, doi:10.1039/c3fo60630a.
100. Bode, L.M.; Bunzel, D.; Huch, M.; Cho, G.S.; Ruhland, D.; Bunzel, M.; Bub, A.; Franz, C.M.A.P.; Kulling, S.E. In Vivo and in Vitro Metabolism of Trans-Resveratrol by Human Gut Microbiota. *American Journal of Clinical Nutrition* **2013**, *97*, 295–309, doi:10.3945/ajcn.112.049379.
101. Rotches-Ribalta, M.; Urpi-Sarda, M.; Llorach, R.; Boto-Ordóñez, M.; Jauregui, O.; Chiva-Blanch, G.; Perez-García, L.; Jaeger, W.; Guillen, M.; Corella, D.; et al. Gut and Microbial Resveratrol Metabolite Profiling after Moderate Long-Term Consumption of Red Wine versus Dealcoholized Red Wine in Humans by an Optimized Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1265*, 105–113, doi:10.1016/J.CHROMA.2012.09.093.
102. Zhang B, Xu Y, Lv H, Pang W, Wang J, Ma H, Wang S. Intestinal Pharmacokinetics of Resveratrol and Regulatory Effects of Resveratrol Metabolites on Gut Barrier and Gut Microbiota. *Food chemistry* **2021**, *357*, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.129532.
103. Landrault N, Larronde F, Delaunay JC, Castagnino C, Vercauteren J, Merillon JM, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50*, 2046–2052, doi:10.1021/JF010794G.
104. Azorín-Ortuño M, Yañez-Gascón MJ, Vallejo F, Pallarés FJ, Larrosa M, Lucas R, Morales JC, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Metabolites and Tissue Distribution of

- Resveratrol in the Pig. *Molecular nutrition & food research* **2011**, *55*, 1154–1168, doi:10.1002/MNFR.201100140.
105. Jannin, B.; Menzel, M.; Berlot, J.P.; Delmas, D.; Lançon, A.; Latruffe, N. Transport of Resveratrol, a Cancer Chemopreventive Agent, to Cellular Targets: Plasmatic Protein Binding and Cell Uptake. In Proceedings of the Biochemical Pharmacology; Biochem Pharmacol, September 15 2004; Vol. 68, pp. 1113–1118.
  106. Wu, M.; Zhong, C.; Deng, Y.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Zhao, X. Resveratrol Loaded Glycyrrhizic Acid-Conjugated Human Serum Albumin Nanoparticles for Tail Vein Injection II: Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Bioavailability. *Drug Delivery* **2020**, *27*, 81–90, doi:10.1080/10717544.2019.1704944.
  107. Gambini, J.; Inglés, M.; Olaso, G.; Lopez-Grueso, R.; Bonet-Costa, V.; Gimeno-Mallench, L.; Mas-Bargues, C.; Abdelaziz, K.M.; Gomez-Cabrera, M.C.; Vina, J.; et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, *2015*.
  108. Wenzel, E.; Somoza, V. Metabolism and Bioavailability of Trans-Resveratrol. *Molecular Nutrition and Food Research* **2005**, *49*, 472–481, doi:10.1002/MNFR.200500010.
  109. de Vries, K.; Strydom, M.; Steenkamp, V. Bioavailability of Resveratrol: Possibilities for Enhancement. *Journal of Herbal Medicine* **2018**, *11*, 71–77, doi:10.1016/J.HERMED.2017.09.002.
  110. Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.H.; Oatis, J.E.; Walle, U.K. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metabolism and Disposition* **2004**, *32*, 1377–1382, doi:10.1124/dmd.104.000885.
  111. Setoguchi, Y.; Oritani, Y.; Ito, R.; Inagaki, H.; Maruki-Uchida, H.; Ichiyanagi, T.; Ito, T. Absorption and Metabolism of Piceatannol in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 2541–2548, doi:10.1021/jf404694y.
  112. Remsberg, C.M.; Martinez, S.E.; Akinwumi, B.C.; Anderson, H.D.; Takemoto, J.K.; Sayre, C.L.; Davies, N.M. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and Content Analysis of Gnetol in Foodstuffs. *Phytotherapy Research* **2015**, *29*, 1168–1179, doi:10.1002/PTR.5363.
  113. Sangsen, Y.; Wiwattanawongsa, K.; Likhitwitayawuid, K.; Sritularak, B.; Wiwattanapatapee, R. Modification of Oral Absorption of Oxyresveratrol Using Lipid Based Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *131*, 182–190, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.055.
  114. Chen, W.; Yeo, S.C.M.; Elhennawy, M.G.A.A.; Lin, H.S. Oxyresveratrol: A Bioavailable Dietary Polyphenol. *Journal of Functional Foods* **2016**, *22*, 122–131, doi:10.1016/J.JFF.2016.01.020.
  115. Junsang, D.; Anukunwithaya, T.; Songvut, P.; Sritularak, B.; Likhitwitayawuid, K.; Khemawoot, P. Comparative Pharmacokinetics of Oxyresveratrol Alone and in Combination with Piperine as a Bioenhancer in Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2019**, *19*, doi:10.1186/S12906-019-2653-Y.
  116. Yeo, S.C.M.; Luo, W.; Wu, J.; Ho, P.C.; Lin, H.-S. Quantification of Pinosylvin in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pre-Clinical Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatography B* **2013**, *931*, 68–74, doi:10.1016/j.jchromb.2013.05.023.
  117. Chen, W.; Yeo, S.C.M.; Chuang, X.F.; Lin, H.-S. Determination of Pinostilbene in Rat Plasma by LC–MS/MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *120*, 316–321, doi:10.1016/j.jpba.2015.12.051.
  118. Lin, H.-S.; Yue, B.-D.; Ho, P.C. Determination of Pterostilbene in Rat Plasma by a Simple HPLC–UV Method and Its Application in Pre-Clinical Pharmacokinetic Study. *Biomedical Chromatography* **2009**, *23*, 1308–1315, doi:10.1002/bmc.1254.

119. Kapetanovic, I.M.; Muzzio, M.; Huang, Z.; Thompson, T.N.; McCormick, D.L. Pharmacokinetics, Oral Bioavailability, and Metabolic Profile of Resveratrol and Its Dimethylether Analog, Pterostilbene, in Rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2011**, *68*, 593, doi:10.1007/S00280-010-1525-4.
120. Yeo, S.C.M.; Ho, P.C.; Lin, H.-S. Pharmacokinetics of Pterostilbene in Sprague-Dawley Rats: The Impacts of Aqueous Solubility, Fasting, Dose Escalation, and Dosing Route on Bioavailability. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57*, 1015–1025, doi:10.1002/mnfr.201200651.
121. Azzolini, M.; la Spina, M.; Mattarei, A.; Paradisi, C.; Zoratti, M.; Biasutto, L. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Pterostilbene in the Rat. *Molecular Nutrition and Food Research* **2014**, *58*, 2122–2132, doi:10.1002/mnfr.201400244.
122. Lv, C.; Zhang, L.; Wang, Q.; Liu, W.; Wang, C.; Jing, X.; Liu, Y. Determination of Piceid in Rat Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatographic Method with UV Detection. *Biomedical Chromatography* **2006**, *20*, 1260–1266, doi:10.1002/bmc.693.
123. Zhou, M.; Chen, X.; Zhong, D. Simultaneous Determination of Trans-Resveratrol-3-O-Glucoside and Its Two Metabolites in Rat Plasma Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B* **2007**, *854*, 219–223, doi:10.1016/j.jchromb.2007.04.025.
124. Mao, P.; Lei, Y.; Zhang, T.; Ma, C.; Jin, B.; Li, T. Pharmacokinetics, Bioavailability, Metabolism and Excretion of  $\delta$ -Viniferin in Rats., doi:10.1016/j.apsb.2016.03.008.
125. Yang, F.-F.; Ji, C.-Y.; Cong, Z.-Q.; Ma, S.-Q.; Liu, C.-Y.; Pan, R.-L.; Chang, Q.; Ji, Y.-B.; Liao, Y.-H. Enhancing in Vivo Oral Bioavailability of Cajaninstilbene Acid Using UDP-Glucuronosyl Transferase Inhibitory Excipient Containing Self-Microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2020**, *193*, 111069, doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111069.
126. Yeo, S.C.M.; Sviripa, V.M.; Huang, M.; Kril, L.; Watt, D.S.; Liu, C.; Lin, H.-S. Analysis of Trans-2,6-Difluoro-4'-(N,N-Dimethylamino)Stilbene (DFS) in Biological Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Metabolite Identification and Pharmacokinetics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 7319–7332, doi:10.1007/s00216-015-8893-x.
127. Dai, Y.; Tan, A.L.C.; Chen, H.; Ong, P.S.; Xiang, X.; Wu, J.; Lin, H.-S. Quantification of Desoxyrhapontigenin (4-Methoxyresveratrol) in Rat Plasma by LC–MS/MS: Application to Pre-Clinical Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *153*, 95–101, doi:10.1016/j.jpba.2018.02.026.
128. Vitrac, X.; Desmoulière, A.; Brouillaud, B.; Krisa, S.; Deffieux, G.; Barthe, N.; Rosenbaum, J.; Mérillon, J.M. Distribution of [ $^{14}\text{C}$ ]-Trans-Resveratrol, a Cancer Chemopreventive Polyphenol, in Mouse Tissues after Oral Administration. *Life sciences* **2003**, *72*, 2219–33.
129. Wang D, Xu Y, Liu W. Tissue Distribution and Excretion of Resveratrol in Rat after Oral Administration of Polygonum Cuspidatum Extract (PCE). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2008**, *15*, 859–866, doi:10.1016/J.PHYMED.2008.02.009.
130. Lin SP, Chu PM, Tsai SY, Wu MH, Hou YC.. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Resveratrol, Emodin and Their Metabolites after Intake of Polygonum Cuspidatum in Rats. *Journal of ethnopharmacology* **2012**, *144*, 671–676, doi:10.1016/J.JEP.2012.10.009.
131. El-Mohsen, M.A.; Bayele, H.; Kuhnle, G.; Gibson, G.; Debnam, E.; Srail, S.K.; Rice-Evans, C.; Spencer, J.P.E. Distribution of [ $^3\text{H}$ ]Trans-Resveratrol in Rat Tissues Following Oral Administration. *British Journal of Nutrition* **2006**, *96*, 62, doi:10.1079/bjn20061810.
132. Böhmendorfer, M.; Szakmary, A.; Schiestl, R.H.; Vaquero, J.; Riha, J.; Brenner, S.; Thalhammer, T.; Szekeres, T.; Jäger, W. Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases in the Excretion and Tissue Distribution of Resveratrol in Mice. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/NU9121347.

133. Andres-Lacueva, C.; Macarulla, M.T.; Rotches-Ribalta, M.; Boto-Ordóñez, M.; Urpi-Sarda, M.; Rodríguez, V.M.; Portillo, M.P. Distribution of Resveratrol Metabolites in Liver, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Rats Fed Different Doses of This Polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 4833–4840, doi:10.1021/jf3001108.
134. Augustin, M.A.; Abeywardena, M.Y.; Patten, G.; Head, R.; Lockett, T.; De Luca, A.; Sanguansri, L. Effects of Microencapsulation on the Gastrointestinal Transit and Tissue Distribution of a Bioactive Mixture of Fish Oil, Tributyrin and Resveratrol. *Journal of Functional Foods* **2011**, *3*, 25–37, doi:10.1016/J.JFF.2011.01.003.
135. Cai, H.; Scott, E.N.; Britton, R.G.; Parrott, E.; Ognibene, T.J.; Malfatti, M.; Khan, M.; Steward, W.P.; Brown, K. Distribution and Metabolism of [<sup>14</sup>C]-Resveratrol in Human Prostate Tissue after Oral Administration of a “Dietary-Achievable” or “Pharmacological” Dose: What Are the Implications for Anticancer Activity? *The American journal of clinical nutrition* **2021**, *113*, 1115–1125, doi:10.1093/ajcn/nqaa414.
136. Deng, L.; Li, Y.; Zhang, X.; Chen, B.; Deng, Y.; Li, Y. UPLC–MS Method for Quantification of Pterostilbene and Its Application to Comparative Study of Bioavailability and Tissue Distribution in Normal and Lewis Lung Carcinoma Bearing Mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, *114*, 200–207, doi:10.1016/J.JPBA.2015.04.045.
137. Su, M.; Dong, C.; Wan, J.; Zhou, M. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Excretion Study of Trans-Resveratrol-3-O-Glucoside and Its Two Metabolites in Rats. **2019**, doi:10.1016/j.phymed.2019.152882.
138. Willenberg, I.; Michael, M.; Wonik, J.; Bartel, L.C.; Empl, M.T.; Schebb, N.H. Investigation of the Absorption of Resveratrol Oligomers in the Caco-2 Cellular Model of Intestinal Absorption. *Food Chemistry* **2015**, *167*, 245–250, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.103.
139. Calvo-Castro, L.A.; Schiborr, C.; David, F.; Ehrh, H.; Voggel, J.; Sus, N.; Behnam, D.; Bosy-Westphal, A.; Frank, J. The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans Is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Molecular Nutrition and Food Research* **2018**, *62*, doi:10.1002/mnfr.201701057.
140. Courtois, A.; Jourdes, M.; Dupin, A.; Lapèze, C.; Renouf, E.; Biais, B.; Teissedre, P.L.; Mérillon, J.M.; Richard, T.; Krisa, S. In Vitro Glucuronidation and Sulfation of  $\epsilon$ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22050733.
141. Willenberg, I.; Brauer, W.; Empl, M.T.; Schebb, N.H. Development of a Rapid LC-UV Method for the Investigation of Chemical and Metabolic Stability of Resveratrol Oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 7844–7850, doi:10.1021/jf302136t.
142. Kim, J.; Min, J.S.; Kim, D.; Zheng, Y.F.; Mailar, K.; Choi, W.J.; Lee, C.; Bae, S.K. A Simple and Sensitive Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Trans- $\epsilon$ -Viniferin Quantification in Mouse Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *134*, 116–121, doi:10.1016/j.jpba.2016.11.044.
143. Courtois, A.; Atgié, C.; Marchal, A.; Hornedo-Ortega, R.; Lapèze, C.; Faure, C.; Richard, T.; Krisa, S. Tissular Distribution and Metabolism of Trans- $\epsilon$ -Viniferin after Intraperitoneal Injection in Rat. *Nutrients* **2018**, *10*, 1–11, doi:10.3390/nu10111660.
144. Medrano-Padial, C.; Puerto, M.; Prieto, A.I.; Ayala, N.; Beaumont, P.; Rouger, C.; Krisa, S.; Pichardo, S. In Vivo Genotoxicity Evaluation of a Stilbene Extract Prior to Its Use as a Natural Additive: A Combination of the Micronucleus Test and the Comet Assay. *Foods* **2021**, *10*, 439, doi:10.3390/foods10020439.
145. Caillaud, M.; Guillard, J.; Richard, D.; Milin, S.; Chassaing, D.; Paccalin, M.; Page, G.; Bilan, A.R. Trans  $\epsilon$  Viniferin Decreases Amyloid Deposits and Inflammation in a Mouse Transgenic Alzheimer Model. *PLoS ONE* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0212663.

146. Tsai, H.Y.; Ho, C.T.; Chen, Y.K. Biological Actions and Molecular Effects of Resveratrol, Pterostilbene, and 3'-Hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis* **2017**, *25*, 134–147, doi:10.1016/J.JFDA.2016.07.004.
147. Riccio, B.V.F.; Fonseca-Santos, B.; Ferrari, P.C.; Chorilli, M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Trans-Resveratrol: A Review. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1637242> **2019**, *50*, 339–358, doi:10.1080/10408347.2019.1637242.
148. Bhat, K.P.L.; Kosmeder, J.W.; Pezzuto, J.M. Biological Effects of Resveratrol. *Antioxidants and Redox Signaling* **2001**, *3*, 1041–1064, doi:10.1089/152308601317203567.
149. Banik, K.; Ranaware, A.M.; Harsha, C.; Nitesh, T.; Girisa, S.; Deshpande, V.; Fan, L.; Nalawade, S.P.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A.B. Piceatannol: A Natural Stilbene for the Prevention and Treatment of Cancer. *Pharmacological Research* **2020**, *153*, 104635, doi:10.1016/J.PHRS.2020.104635.
150. Kershaw, J.; Kim, K.H. The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review. *Journal of medicinal food* **2017**, *20*, 427–438, doi:10.1089/JMF.2017.3916.
151. Piotrowska, H.; Kucinska, M.; Murias, M. Biological Activity of Piceatannol: Leaving the Shadow of Resveratrol. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **2012**, *750*, 60–82, doi:10.1016/J.MRREV.2011.11.001.
152. Medrano-padiá, C.; Prieto, A.I.; Puerto, M.; Pichardo, S. Toxicological Evaluation of Piceatannol, Pterostilbene, and E-viniferin for Their Potential Use in the Food Industry: A Review. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/FOODS10030592.
153. Cassard-Doulier, A.-M.; Perlemuter, G. Inflammation Hépatique Liée à l'obésité (NASH). *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **2011**, *18*, 21–26, doi:10.1051/OCL.2011.0363.
154. Pais, R.; Lebray, P.; Rousseau, G.; Charlotte, F.; Esselma, G.; Savier, E.; Thabut, D.; Rudler, M.; Eyraud, D.; Vezinet, C.; et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Alcohol-Associated Cirrhosis Awaiting Liver Transplants. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2015**, *13*, 992-999.e2, doi:10.1016/J.CGH.2014.10.011.
155. Pais, R. L'inflammation Hépatique Dans Les Formes Sévères de NAFLD: Implications Cliniques, Médiateurs et Stratégies Diagnostiques. <http://www.theses.fr> **2015**.
156. Lonardo, A.; Byrne, C.D.; Caldwell, S.H.; Cortez-Pinto, H.; Targher, G. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology* **2016**, *64*, 1388–1389, doi:10.1002/HEP.28584.
157. Koonen, D.P.Y.; Jacobs, R.L.; Febrario, M.; Young, M.E.; Soltys, C.-L.M.; Ong, H.; Vance, D.E.; Dyck, J.R.B. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes* **2007**, *56*, 2863–2871, doi:10.2337/DB07-0907.
158. Browning, J.D.; Horton, J.D. Molecular Mediators of Hepatic Steatosis and Liver Injury. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *114*, 147–152, doi:10.1172/JCI22422.
159. Postic, C.; Girard, J. Contribution of de Novo Fatty Acid Synthesis to Hepatic Steatosis and Insulin Resistance: Lessons from Genetically Engineered Mice. *The Journal of Clinical Investigation* **2008**, *118*, 829, doi:10.1172/JCI34275.
160. Koyama, Y.; Brenner, D.A. Liver Inflammation and Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* **2017**, *127*, 55, doi:10.1172/JCI88881.
161. Marie-Claude Roy, M. Implication de La Protéine Découplante 2 (UCP2) Dans La Réponse Au Stress.
162. Aguirre, L.; Portillo, M.P.; Hijona, E.; Bujanda, L. Effects of Resveratrol and Other Polyphenols in Hepatic Steatosis. *World Journal of Gastroenterology* **2014**, *20*, 7366–7380, doi:10.3748/WJG.V20.I23.7366.

163. Shang, J.; Chen, L.; Xiao, F.; Sun, H.; Ding, H.; Xiao, H. Resveratrol Improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Acta Pharmacologica Sinica* **2008**, *29*, 698–706, doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00807.x.
164. Gnoni, G. v.; Paglialonga, G. Resveratrol Inhibits Fatty Acid and Triacylglycerol Synthesis in Rat Hepatocytes. *European Journal of Clinical Investigation* **2009**, *39*, 211–218, doi:10.1111/J.1365-2362.2008.02077.X.
165. Wang, G.L.; Fu, Y.C.; Xu, W.C.; Feng, Y.Q.; Fang, S.R.; Zhou, X.H. Resveratrol Inhibits the Expression of SREBP1 in Cell Model of Steatosis via Sirt1–FOXO1 Signaling Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**, *380*, 644–649, doi:10.1016/J.BBRC.2009.01.163.
166. Poulsen, M.M.; Larsen, J.; Hamilton-Dutoit, S.; Clasen, B.F.; Jessen, N.; Paulsen, S.K.; Kjær, T.N.; Richelsen, B.; Pedersen, S.B. Resveratrol Up-Regulates Hepatic Uncoupling Protein 2 and Prevents Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats Fed a High-Fat Diet. *Nutrition Research* **2012**, *32*, 701–708, doi:10.1016/j.nutres.2012.08.004.
167. Andrade, J.M.O.; Paraíso, A.F.; de Oliveira, M.V.M.; Martins, A.M.E.; Neto, J.F.; Guimarães, A.L.S.; de Paula, A.M.; Qureshi, M.; Santos, S.H.S. Resveratrol Attenuates Hepatic Steatosis in High-Fat Fed Mice by Decreasing Lipogenesis and Inflammation. *Nutrition* **2014**, *30*, 915–919, doi:10.1016/J.NUT.2013.11.016.
168. Ding, S.; Jiang, J.; Zhang, G.; Bu, Y.; Zhang, G.; Zhao, X. Resveratrol and Caloric Restriction Prevent Hepatic Steatosis by Regulating SIRT1–Autophagy Pathway and Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress in High-Fat Diet-Fed Rats. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0183541, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0183541.
169. Ji, G.; Wang, Y.; Deng, Y.; Li, X.; Jiang, Z. Resveratrol Ameliorates Hepatic Steatosis and Inflammation in Methionine/Choline-Deficient Diet-Induced Steatohepatitis through Regulating Autophagy. *Lipids in Health and Disease* **2015**, *14*, doi:10.1186/s12944-015-0139-6.
170. Tan, H.Y.; Tse, I.M.Y.; Li, E.T.S.; Wang, M. Oxyresveratrol Supplementation to C57bl/6 Mice Fed with a High-Fat Diet Ameliorates Obesity-Associated Symptoms. *Nutrients* **2017**, *Vol. 9*, Page 147 **2017**, *9*, 147, doi:10.3390/NU9020147.
171. Ju-Hee, L.; Ju-Hee, L.; Youn, B.S.; Jeong, J.E.; Kwang, K.S.; Min, K.K.; Hwan, K.S.; Chang-Eop, K.; Il, P.K.; Chan, K.S.; et al. Oxyresveratrol Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Hepatic Lipogenesis and Fatty Acid Oxidation through Liver Kinase B1 and AMP-Activated Protein Kinase. *Chemico-Biological Interactions* **2018**, *289*, 68–74.
172. Yang, J.S.; Tongson, J.; Kim, K.H.; Park, Y. Piceatannol Attenuates Fat Accumulation and Oxidative Stress in Steatosis-Induced HepG2 Cells. *Current Research in Food Science* **2020**, *3*, 92–99, doi:10.1016/J.CRFS.2020.03.008.
173. Trepiana, J.; Krisa, S.; Portillo, M.P.; Puy, M.; Activity, P.; Magrone, T.; Valenzuela, R.; Petrelli, R. Activity of Pterostilbene Metabolites against Liver Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Molecules* **2020**, *25*, 1–10, doi:10.3390/molecules25225444i.
174. Aguirre, L.; Palacios-Ortega, S.; Fernández-Quintela, A.; Hijona, E.; Bujanda, L.; Portillo, M.P. Pterostilbene Reduces Liver Steatosis and Modifies Hepatic Fatty Acid Profile in Obese Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11050961.
175. Gómez-Zorita, S.; Milton-Laskibar, I.; Macarulla, M.T.; Biasutto, L.; Fernández-Quintela, A.; Miranda, J.; Lasa, A.; Segues, N.; Bujanda, L.; Portillo, M.P. Pterostilbene Modifies Triglyceride Metabolism in Hepatic Steatosis Induced by High-Fat High-Fructose Feeding: A Comparison with Its Analog Resveratrol. *Food and Function* **2021**, *12*, 3266–3279, doi:10.1039/d0fo03320k.
176. Gómez-Zorita, S.; González-Arceo, M.; Trepiana, J.; Aguirre, L.; Crujeiras, A.B.; Irlles, E.; Segues, N.; Bujanda, L.; Portillo, M.P. Comparative Effects of Pterostilbene and Its Parent Compound Resveratrol on Oxidative Stress and Inflammation in Steatohepatitis Induced by

- High-Fat High-Fructose Feeding. *Antioxidants* **2020**, Vol. 9, Page 1042 **2020**, 9, 1042, doi:10.3390/ANTIOX9111042.
177. Tejada, S.; Capó, X.; Mascaró, C.M.; Monserrat-Mesquida, M.; Quetglas-Llabrés, M.M.; Pons, A.; Tur, J.A.; Sureda, A. Hepatoprotective Effects of Resveratrol in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Current Pharmaceutical Design* **2020**, 27, 2558–2570, doi:10.2174/1381612826666200417165801.
178. Bujanda, L.; Hijona, E.; Larzabal, M.; Beraza, M.; Aldazabal, P.; García-Urkia, N.; Sarasqueta, C.; Cosme, A.; Irastorza, B.; González, A.; et al. Resveratrol Inhibits Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *BMC Gastroenterology* **2008**, 8, 40, doi:10.1186/1471-230X-8-40.
179. Trepiana, J.; Krisa, S.; Renouf, E.; Portillo, M.P. Resveratrol Metabolites Are Able to Reduce Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Pharmaceuticals* **2020**, 13, 1–17, doi:10.3390/ph13100285.
180. Luca, S.V.; Macovei, I.; Bujor, A.; Miron, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Aprotosoai, A.C.; Trifan, A. Bioactivity of Dietary Polyphenols: The Role of Metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, 60, 626–659, doi:10.1080/10408398.2018.1546669.
181. López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; Sanches-Silva, A.T.; Lage-Yusty, M.A. Study of the Changes of Trans-Resveratrol Caused by Ultraviolet Light and Determination of Trans- and Cis-Resveratrol in Spanish White Wines. *European Food Research and Technology* **2007**, 225, 789–796, doi:10.1007/s00217-006-0483-x.
182. Silva, C.G.; Monteiro, J.; Marques, R.R.N.; Silva, A.M.T.; Martínez, C.; Canle L., M.; Faria, J.L. Photochemical and Photocatalytic Degradation of Trans-Resveratrol. In Proceedings of the Photochemical and Photobiological Sciences; Royal Society of Chemistry, 2013; Vol. 12, pp. 638–644.
183. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Resveratrol Encapsulation: Designing Delivery Systems to Overcome Solubility, Stability and Bioavailability Issues. *Trends in Food Science and Technology* **2014**, 38, 88–103, doi:10.1016/j.tifs.2014.05.003.
184. Shi, G.; Rao, L.; Yu, H.; Xiang, H.; Yang, H.; Ji, R. Stabilization and Encapsulation of Photosensitive Resveratrol within Yeast Cell. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 349, 83–93, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.044.
185. Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. Interaction of Beta-Lactoglobulin with Resveratrol and Its Biological Implications. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 50–56, doi:10.1021/BM700728K.
186. Augustin, M.A.; Sanguansri, L.; Lockett, T. Nano- and Micro-Encapsulated Systems for Enhancing the Delivery of Resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2013**, 1290, 107–112, doi:10.1111/nyas.12130.
187. Lu, W.; Kelly, A.L.; Miao, S. Emulsion-Based Encapsulation and Delivery Systems for Polyphenols. *Trends in Food Science and Technology* **2016**, 47, 1–9, doi:10.1016/j.tifs.2015.10.015.
188. Aditya, N.P.; Aditya, S.; Yang, H.; Kim, H.W.; Park, S.O.; Ko, S. Co-Delivery of Hydrophobic Curcumin and Hydrophilic Catechin by a Water-in-Oil-in-Water Double Emulsion. *Food Chemistry* **2015**, 173, 7–13, doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.131.
189. Summerlin, N.; Soo, E.; Thakur, S.; Qu, Z.; Jambhrunkar, S.; Popat, A. Resveratrol Nanoformulations: Challenges and Opportunities. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, 479, 282–290, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.01.003.
190. Neves, A.R.; Lúcio, M.; Martins, S.; Lima, J.L.C.; Reis, S. Novel Resveratrol Nanodelivery Systems Based on Lipid Nanoparticles to Enhance Its Oral Bioavailability. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, 8, 177–187, doi:10.2147/IJN.S37840.
191. Mora Huertas, C. Obtention de Nanoparticules à Base de Polymères : Étude Fondamentale et Application Au Développement de Nanocapsules à Usage Pédiatrique.
192. Storm, G.; Crommelin, D.J.A. Liposomes: Quo Vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today* **1998**, 1, 19–31, doi:10.1016/S1461-5347(98)00007-8.

193. Franzen, U.; Østergaard, J. Physico-Chemical Characterization of Liposomes and Drug Substance-Liposome Interactions in Pharmaceutics Using Capillary Electrophoresis and Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1267*, 32–44, doi:10.1016/j.chroma.2012.07.018.
194. Kerdudo, A. Optimisation de La Conservation Des Cosmétiques : Impact de La Formulation, Recherche de Nouveaux Conservateurs Naturels, Encapsulation.
195. Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. Les Liposomes: Description, Fabrication et Applications. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* **2004**, *8*, 163–176.
196. Franzen, U.; Østergaard, J. Physico-Chemical Characterization of Liposomes and Drug Substance-Liposome Interactions in Pharmaceutics Using Capillary Electrophoresis and Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1267*, 32–44, doi:10.1016/j.chroma.2012.07.018.
197. O’Leary, E.I.; Jiang, Z.; Strub, M.-P.; Lee, J.C. Effects of Phosphatidylcholine Membrane Fluidity on the Conformation and Aggregation of N-Terminally Acetylated  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 11195–11205, doi:10.1074/JBC.RA118.002780.
198. Patil, Y.P.; Jadhav, S. Novel Methods for Liposome Preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* **2014**, *177*, 8–18, doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2013.10.011.
199. Ahmed, K.S.; Hussein, S.A.; Ali, A.H.; Korma, S.A.; Lipeng, Q.; Jinghua, C. Liposome: Composition, Characterisation, Preparation, and Recent Innovation in Clinical Applications. *Journal of Drug Targeting* **2019**, *27*, 742–761, doi:10.1080/1061186X.2018.1527337.
200. Courtois, A.; Garcia, M.; Krisa, S.; Atgié, C.; Sauvant, P.; Richard, T.; Faure, C. Encapsulation of  $\epsilon$ -Viniferin in Onion-Type Multi-Lamellar Liposomes Increases Its Solubility and Its Photo-Stability and Decreases Its Cytotoxicity on Caco-2 Intestinal Cells. *Food and Function* **2019**, *10*, 2573–2582, doi:10.1039/c9fo00420c.
201. Angelova, M.I.; Dimitrov, D.S. Liposome Electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **1986**, *81*, 303–311, doi:10.1039/DC9868100303.
202. Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H. Ethanol Injection Method for Hydrophilic and Lipophilic Drug-Loaded Liposome Preparation. *Journal of Liposome Research* **2010**, *20*, 228–243, doi:10.3109/08982100903347923.
203. Gouda, A.; Sakr, O.S.; Nasr, M.; Sammour, O. Ethanol Injection Technique for Liposomes Formulation: An Insight into Development, Influencing Factors, Challenges and Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, *61*, 102174, doi:10.1016/J.JDDST.2020.102174.
204. Shi, N.-Q.; Qi, X.-R. Preparation of Drug Liposomes by Reverse-Phase Evaporation. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* **2018**, 1–10, doi:10.1007/978-3-662-49231-4\_3-1.
205. Schubert, R. Liposome Preparation by Detergent Removal. *Methods in enzymology* **2003**, *367*, 46–70, doi:10.1016/S0076-6879(03)67005-9.
206. Delattre, L. Applications Pharmaceutiques Du Dioxyde de Carbone Supercritique. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2007**, *65*, 58–67, doi:10.1016/S0003-4509(07)90017-6.
207. Huang, Z.; Li, X.; Zhang, T.; Song, Y.; She, Z.; Li, J.; Deng, Y. Progress Involving New Techniques for Liposome Preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *9*, 176–182, doi:10.1016/J.AJPS.2014.06.001.
208. Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*, 102, doi:10.1186/1556-276X-8-102.
209. Isailović, B.D.; Kostić, I.T.; Zvonar, A.; Dordević, V.B.; Gašperlin, M.; Nedović, V.A.; Bugarski, B.M. Resveratrol Loaded Liposomes Produced by Different Techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2013**, *19*, 181–189, doi:10.1016/j.ifset.2013.03.006.



210. Haghirsadat, F.; Amoabediny, G.; Naderinezhad, S.; Helder, M.N.; Akhouni Kharanaghi, E.; Zandieh-Doulabi, B. Overview of Preparation Methods of Polymeric and Lipid-Based (Noisome, Solid Lipid, Liposome) Nanoparticles: A Comprehensive Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2017**, doi:10.1080/00914037.2017.1332623.
211. Mahale, N.B.; Thakkar, P.D.; Mali, R.G.; Walunj, D.R.; Chaudhari, S.R. Niosomes: Novel Sustained Release Nonionic Stable Vesicular Systems - An Overview. *Advances in Colloid and Interface Science* **2012**, 183–184, 46–54, doi:10.1016/j.cis.2012.08.002.
212. Caddeo, C.; Teskač, K.; Sinico, C.; Kristl, J. Effect of Resveratrol Incorporated in Liposomes on Proliferation and UV-B Protection of Cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 363, 183–191, doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.024.
213. Coimbra, M.; Isacchi, B.; Van Bloois, L.; Torano, J.S.; Ket, A.; Wu, X.; Broere, F.; Metselaar, J.M.; Rijcken, C.J.F.; Storm, G.; et al. Improving Solubility and Chemical Stability of Natural Compounds for Medicinal Use by Incorporation into Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, 416, 433–442, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.056.
214. Pando, D.; Gutiérrez, G.; Coca, J.; Pazos, C. Preparation and Characterization of Niosomes Containing Resveratrol. *Journal of Food Engineering* **2013**, 117, 227–234, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.02.020.
215. Vara, J.; Sanchez, J.M.; Perillo, M.A.; Ortiz, C.S. Phospholipid Multilamellar Vesicles Entrapping Phenothiazine Photosensitizers. Preparation, Characterization and Evaluation of Their Photodynamic Properties. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, 273, 147–154, doi:10.1016/j.molliq.2018.10.009.
216. Negi, P.; Aggarwal, M.; Sharma, G.; Rathore, C.; Sharma, G.; Singh, B.; Katare, O.P. Niosome-Based Hydrogel of Resveratrol for Topical Applications: An Effective Therapy for Pain Related Disorder(s). *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2017**, 88, 480–487, doi:10.1016/j.biopha.2017.01.083.
217. Tavano, L.; Muzzalupo, R.; Picci, N.; De Cindio, B. Co-Encapsulation of Lipophilic Antioxidants into Niosomal Carriers: Percutaneous Permeation Studies for Cosmeceutical Applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 114, 144–149, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.055.
218. Meng, J.; Guo, F.; Xu, H.; Liang, W.; Wang, C.; Yang, X. da Combination Therapy Using Co-Encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells in Vivo. *Scientific Reports* **2016**, 6, 1–11, doi:10.1038/srep22390.
219. Scognamiglio, I.; De Stefano, D.; Campani, V.; Mayol, L.; Carnuccio, R.; Fabbrocini, G.; Ayala, F.; La Rotonda, M.I.; De Rosa, G. Nanocarriers for Topical Administration of Resveratrol: A Comparative Study. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 440, 179–187, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.009.
220. Diat, O.; Roux, D. Preparation of Monodisperse Multilayer Vesicles of Controlled Size and High Encapsulation Ratio. *Journal de Physique II* **1993**, 3, 9–14, doi:10.1051/JP2:1993106.
221. Diat, O.; Roux, D.; Nallet, F. Effect of Shear on a Lyotropic Lamellar Phase. *Journal de Physique II* **1993**, 3, 1427–1452, doi:10.1051/JP2:1993211.
222. Crauste-Manciet, S.; Khawand, K.; Mignet, N. Spherulites: Onion-like Vesicles as Nanomedicines. *Therapeutic Delivery* **2015**, 6, 1377–1385, doi:10.4155/tde.14.81.
223. Touti, R.; Noun, M.; Guimberteau, F.; Lecomte, S.; Faure, C. What Is the Fate of Multi-Lamellar Liposomes of Controlled Size, Charge and Elasticity in Artificial and Animal Skin? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, 151, 18–31, doi:10.1016/j.ejpb.2020.03.017.
224. Mignet, N. The Spherulites<sup>TM</sup>: A Promising Carrier for Oligonucleotide Delivery. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 3134–3142, doi:10.1093/nar/28.16.3134.

225. Simard, P.; Hoarau, D.; Khalid, M.N.; Roux, E.; Leroux, J.-C. Preparation and in Vivo Evaluation of PEGylated Spherulite Formulations. **2005**, doi:10.1016/j.bbamem.2005.06.013.
226. Sautot, P. Propriétés d' Auto-Assemblage de Phospholipides Riches En Acides Gras Polyinsaturés : Caractérisation Physico-Chimique et Simulation de Bicouches Par Dynamique Moléculaire To Cite This Version : HAL Id : Tel-01749542 Soutenance et Mis à Disposition de l . **2018**.
227. Freund, O.; Lle Amždee, J.'; Roux, D.; Laviersanne, R. In Vitro and in Vivo Stability of New Multilamellar Vesicles. *Life Sciences* **2000**, *67*, 411–419.
228. Crauste-Manciet, S.; Larquet, E.; Khawand, K.; Bessodes, M.; Chabot, G.G.; Brossard, D.; Mignet, N. Lipidic Spherulites: Formulation Optimisation by Paired Optical and Cryoelectron Microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *85*, 1088–1094, doi:10.1016/j.ejpb.2013.02.016.
229. Freund, O. Biodistribution and Gastrointestinal Drug Delivery of New Lipidic Multilamellar Vesicles. *Drug Delivery* **2001**, *8*, 239–244, doi:10.1080/107175401317245921.
230. Mignet, N.; Seguin, J.; Chabot, G.G. Bioavailability of Polyphenol Liposomes: A Challenge Ahead. *Pharmaceutics* **2013**, *5*, 457–471, doi:10.3390/pharmaceutics5030457.
231. Olea, D.; Faure, C. Quantitative Study of the Encapsulation of Glucose Oxidase into Multilamellar Vesicles and Its Effect on Enzyme Activity. *Journal of Chemical Physics* **2003**, *119*, 6111–6118, doi:10.1063/1.1601598.
232. Meyre, M.-E.; Raffard, G.; Franconi, J.-M.; Duguet, E.; Lambert, O.; Faure, C. Production of Magnetic Multilamellar Liposomes as Highly T2-Efficient MRI Contrast Agents. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2011**, *7*, 18–21, doi:10.1016/j.nano.2010.10.011.
233. Kerdudo, A.; Dingas, A.; Fernandez, X.; Faure, C. Encapsulation of Rutin and Naringenin in Multilamellar Vesicles for Optimum Antioxidant Activity. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 12–19, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.005.
234. Chimento, A.; De Amicis, F.; Sirianni, R.; Sinicropi, M.S.; Puoci, F.; Casaburi, I.; Saturnino, C.; Pezzi, V. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20061381.
235. Lu, X.Y.; Hu, S.; Jin, Y.; Qiu, L.Y. Application of Liposome Encapsulation Technique to Improve Anti-Carcinoma Effect of Resveratrol. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2012**, *38*, 314–322, doi:10.3109/03639045.2011.602410.
236. Ansari, K.A.; Vavia, P.R.; Trotta, F.; Cavalli, R. Cyclodextrin-Based Nanosponges for Delivery of Resveratrol: In Vitro Characterisation, Stability, Cytotoxicity and Permeation Study. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 279–286, doi:10.1208/s12249-011-9584-3.
237. Zu, Y.; Overby, H.; Ren, G.; Fan, Z.; Zhao, L.; Wang, S. Resveratrol Liposomes and Lipid Nanocarriers: Comparison of Characteristics and Inducing Browning of White Adipocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *164*, 414–423, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.12.044.
238. Wei, K.; Wan, S.; Zhang, L.; Quan, Y. Resveratrol-Loaded PLGA Nanoparticles: Enhanced Stability, Solubility and Bioactivity of Resveratrol for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Therapy. **2018**, doi:10.1098/rsos.181457.
239. Sessa, M.; Balestrieri, M.L.; Ferrari, G.; Servillo, L.; Castaldo, D.; D'onofrio, N.; Donsì, F.; Tsao, R. Bioavailability of Encapsulated Resveratrol into Nanoemulsion-Based Delivery Systems. *Food Chemistry* **2014**, *147*, 42–50, doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.088.
240. Shaikh, J.; Ankola, D.D.; Beniwal, V.; Singh, D.; Kumar, M.N.V.R. Nanoparticle Encapsulation Improves Oral Bioavailability of Curcumin by at Least 9-Fold When Compared to Curcumin Administered with Piperine as Absorption Enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *37*, 223–230, doi:10.1016/j.ejps.2009.02.019.

241. Tsai, Y.M.; Chien, C.F.; Lin, L.C.; Tsai, T.H. Curcumin and Its Nano-Formulation: The Kinetics of Tissue Distribution and Blood-Brain Barrier Penetration. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *416*, 331–338, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.06.030.
242. Dian, L.; Yu, E.; Chen, X.; Wen, X.; Zhang, Z.; Qin, L.; Wang, Q.; Li, G.; Wu, C. Enhancing Oral Bioavailability of Quercetin Using Novel Soluplus Polymeric Micelles. *Nanoscale Research Letters* **2014**, doi:10.1186/1556-276X-9-684.
243. Yen, C.C.; Chang, C.W.; Hsu, M.C.; Wu, Y.T. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Resveratrol: Enhanced Oral Bioavailability and Reduced Physical Fatigue in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18091853.
244. Penalva, R.; Esparza, I.; Larraneta, E.; González-Navarro, C.J.; Gamazo, C.; Irache, J.M. Zein-Based Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Resveratrol and Its Anti-Inflammatory Effects in a Mouse Model of Endotoxic Shock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 5603–5611, doi:10.1021/jf505694e.
245. Peñalva, R.; Morales, J.; González-Navarro, C.; Larrañeta, E.; Quincoces, G.; Peñuelas, I.; Irache, J. Increased Oral Bioavailability of Resveratrol by Its Encapsulation in Casein Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 2816, doi:10.3390/ijms19092816.
246. Pandita, D.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V. Solid Lipid Nanoparticles Enhance Oral Bioavailability of Resveratrol, a Natural Polyphenol. *Food Research International* **2014**, *62*, 1165–1174, doi:10.1016/j.foodres.2014.05.059.
247. Narayanan, N.K.; Nargi, D.; Randolph, C.; Narayanan, B.A. Liposome Encapsulation of Curcumin and Resveratrol in Combination Reduces Prostate Cancer Incidence in PTEN Knockout Mice. *International Journal of Cancer* **2009**, *125*, 1–8, doi:10.1002/ijc.24336.
248. Frozza, R.L.; Bernardi, A.; Paese, K.; Hoppe, J.B.; Da Silva, T.; Battastini, A.M.O.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Salbego, C. Characterization of Trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2010**, *6*, 694–703, doi:10.1166/jbn.2010.1161.
249. Howells, L.M.; Berry, D.P.; Elliott, P.J.; Jacobson, E.W.; Hoffmann, E.; Hegarty, B.; Brown, K.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics Safety, — Resveratrol (SRT501) in Patients with Hepatic Metastases Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Updated Version E-Mail Alerts Subscriptions Reprints and Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Resveratrol (SRT501) in Patients with Hepatic Metastases-Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Cancer Prev Res* **2011**, *4*, 1419–1425, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148.
250. Basavaraj, S.; Betageri, G. V. Improved Oral Delivery of Resveratrol Using Proliposomal Formulation: Investigation of Various Factors Contributing to Prolonged Absorption of Unmetabolized Resveratrol. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2014**, *11*, 493–503, doi:10.1517/17425247.2014.878701.
251. Vijayakumar, M.R.; Vajanthri, K.Y.; Balavigneswaran, C.K.; Mahto, S.K.; Mishra, N.; Muthu, M.S.; Singh, S. Pharmacokinetics, Biodistribution, in Vitro Cytotoxicity and Biocompatibility of Vitamin E TPGS Coated Trans Resveratrol Liposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *145*, 479–491, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.037.
252. Siu, F.Y.K.; Ye, S.; Lin, H.; Li, S. Galactosylated PLGA Nanoparticles for the Oral Delivery of Resveratrol: Enhanced Bioavailability and in Vitro Anti-Inflammatory Activity. *International Journal of Nanomedicine* **2018**, *13*, 4133–4144, doi:10.2147/IJN.S164235.
253. Yen, C.C.; Chang, C.W.; Hsu, M.C.; Wu, Y.T. Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Resveratrol: Enhanced Oral Bioavailability and Reduced Physical Fatigue in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18091853.
254. Subramanian, P. Lipid-Based Nanocarrier System for the Effective Delivery of Nutraceuticals. *Molecules* **2021**, *Vol. 26*, Page 5510 **2021**, *26*, 5510, doi:10.3390/MOLECULES26185510.

255. Willenberg, I.; Brauer, W.; Empl, M.T.; Schebb, N.H. Development of a Rapid LC-UV Method for the Investigation of Chemical and Metabolic Stability of Resveratrol Oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 7844–7850, doi:10.1021/jf302136t.
256. Courtois, A.; Atgié, C.; Marchal, A.; Hornedo-Ortega, R.; Lapèze, C.; Faure, C.; Richard, T.; Krisa, S. Tissular Distribution and Metabolism of Trans- $\epsilon$ -Viniferin after Intraperitoneal Injection in Rat. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10111660.
257. Wang, L.X.; Heredia, A.; Song, H.; Zhang, Z.; Yu, B.; Davis, C.; Redfield, R. Resveratrol Glucuronides as the Metabolites of Resveratrol in Humans: Characterization, Synthesis, and Anti-HIV Activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *93*, 2448–2457, doi:10.1002/jps.20156.
258. Learmonth, D.A. A Concise Synthesis of the 3-O- $\beta$ -D- and 4'-O- $\beta$ -D-Glucuronide Conjugates of Trans-Resveratrol. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 262–267, doi:10.1021/bc020048x.
259. Iwuchukwu, O.F.; Sharan, S.; Canney, D.J.; Nagar, S. Analytical Method Development for Synthesized Conjugated Metabolites of Trans-Resveratrol, and Application to Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *63*, 1–8, doi:10.1016/j.jpba.2011.12.006.
260. Boumendjel, A.; Blanc, M.; Williamson, G.; Barron, D. Efficient Synthesis of Flavanone Glucuronides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 7264–7267, doi:10.1021/jf9011467.
261. de Fátima, Â.; Docampo-Palacios, M.; Alvarez-Hernandez, A.; Pasinetti, G.M.; Dixon, R.A. An Efficient Synthesis of Deoxyrhapontigenin-3- O- $\beta$ - d -Glucuronide, a Brain-Targeted Derivative of Dietary Resveratrol, and Its Precursor 4'- O-Me-Resveratrol. *ACS Omega* **2019**, *4*, 8222–8230, doi:10.1021/acsomega.9b00722.
262. Almeida, A.F.; Santos, C.N.; Ventura, M.R. Synthesis of New Sulfated and Glucuronated Metabolites of Dietary Phenolic Compounds Identified in Human Biological Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 6460–6466, doi:10.1021/acs.jafc.6b05629.
263. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes (Text with EEA Relevance).
264. Fda; Cder *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations*; 2018;
265. Springer, M.; Moco, S. Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/NU11010143.
266. Su, M.; Dong, C.; Wan, J.; Zhou, M. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Excretion Study of Trans-Resveratrol-3-O-Glucoside and Its Two Metabolites in Rats. *Phytomedicine* **2019**, *58*, 152882, doi:10.1016/j.phymed.2019.152882.
267. Qiu, Z.; Yu, J.; Dai, Y.; Chen, X.; Huang, F.; Li, N. A Simple LC–MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Resveratrol and Its Major Phase II Metabolites: Assessment of Their Urinary and Biliary Excretions in Rats. *Journal of Chromatography B* **2017**, *1048*, 85–93, doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.011.
268. Szymanowski, F.; Hugo, A.A.; Alves, P.; Simões, P.N.; Gómez-Zavaglia, A.; Pérez, P.F. Endocytosis and Intracellular Traffic of Cholesterol-PDMAEMA Liposome Complexes in Human Epithelial-like Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *156*, 38–43, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.04.058.
269. Guimarães, D.; Cavaco-Paulo, A.; Nogueira, E. Design of Liposomes as Drug Delivery System for Therapeutic Applications. *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, *601*, doi:10.1016/J.IJPHARM.2021.120571.

270. Takikawa, M.; Fujisawa, M.; Yoshino, K.; Takeoka, S. Intracellular Distribution of Lipids and Encapsulated Model Drugs from Cationic Liposomes with Different Uptake Pathways. *International Journal of Nanomedicine* **2020**, *15*, 8401–8409, doi:10.2147/IJN.S267638.
271. Kim, H.; Kim, Y.; Lee, J. Liposomal Formulations for Enhanced Lymphatic Drug Delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *8*, 96–103, doi:10.1016/J.AJPS.2013.07.012.
272. Magnuson, A.M.; Fouts, J.K.; Regan, D.P.; Booth, A.D.; Dow, S.W.; Foster, M.T.; Author, P.B. Adipose Tissue Extrinsic Factor: Obesity-Induced Inflammation and the Role of the Visceral Lymph Node HHS Public Access Author Manuscript. *Physiol Behav* **2018**, *190*, 71–81, doi:10.1016/j.physbeh.2018.02.044.
273. Diment, S.; Dean, M.F. Receptor-Mediated Endocytosis of Fibroblast  $\beta$ -Glucuronidase by Peritoneal Macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1983**, *762*, 165–174, doi:10.1016/0167-4889(83)90068-X.
274. Kaneko, A.; Matsumoto, T.; Matsubara, Y.; Sekiguchi, K.; Koseki, J.; Yakabe, R.; Aoki, K.; Aiba, S.; Yamasaki, K. Glucuronides of Phytoestrogen Flavonoid Enhance Macrophage Function via Conversion to Aglycones by  $\beta$ -Glucuronidase in Macrophages. *Immunity, Inflammation and Disease* **2017**, *5*, 265–279, doi:10.1002/iid3.163.
275. Ohara, K.; Kusano, K.; Kitao, S.; Yanai, T.; Takata, R.; Kanauchi, O.  $\epsilon$ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, Prevents Diet-Induced Obesity in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *468*, 877–882, doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.047.
276. Liu, R.; Zhang, Y.; Yao, X.; Wu, Q.; Wei, M.; Yan, Z.  $\epsilon$ -Viniferin, a Promising Natural Oligostilbene, Ameliorates Hyperglycemia and Hyperlipidemia by Activating AMPK: In Vivo. *Food and Function* **2020**, *11*, 10084–10093, doi:10.1039/d0fo01932a.
277. Trepiana, J.; Krisa, S.; Portillo, M.P. Activity of Pterostilbene Metabolites against Liver Steatosis in Cultured Hepatocytes. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/MOLECULES25225444.
278. Aja-Perez, I.; Krisa, S.; Hornedo-Ortega, R.; Ruiz-Larrea, M.B.; Ruiz-Sanz, J.I.; Richard, T.; Courtois, A. Stilbenes at Low Micromolar Concentrations Mitigate the NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and ROS Production in LPS-Stimulated Murine Macrophages. <https://doi.org/10.1080/22311866.2021.1923571> **2021**, *11*, 212–222, doi:10.1080/22311866.2021.1923571.
279. Walker, J.; Schueller, K.; Schaefer, L.-M.; Pignitter, M.; Esefelder, L.; Somoza, V. Resveratrol and Its Metabolites Inhibit Pro-Inflammatory Effects of Lipopolysaccharides in U-937 Macrophages in Plasma-Representative Concentrations. *Food Funct.* **2014**, *5*, 74–84, doi:10.1039/C3FO60236B.
280. Shimoi, K.; Nakayama, T. Glucuronidase Deconjugation in Inflammation. In *Methods in enzymology*; Methods Enzymol, 2005; Vol. 400, pp. 263–272.
281. Ardévol, A.; Motilva, M.J.; Serra, A.; Blay, M.; Pinent, M. Procyanidins Target Mesenteric Adipose Tissue in Wistar Lean Rats and Subcutaneous Adipose Tissue in Zucker Obese Rat. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 160–166, doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.104.
282. Patel, K.R.; Brown, V.A.; Jones, D.J.L.; Britton, R.G.; Hemingway, D.; Miller, A.S.; West, K.P.; Booth, T.D.; Perloff, M.; Crowell, J.A.; et al. Clinical Pharmacology of Resveratrol and Its Metabolites in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Research* **2010**, *70*, 7392–7399, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2027.