



**HAL**  
open science

# Evaluation des potentiels neurotrophiques d'huiles essentielles, de stilbènes et d'oxystérols sur des modèles cellulaires de neurodégénérescence in vitro

Mohamed Ksila

► **To cite this version:**

Mohamed Ksila. Evaluation des potentiels neurotrophiques d'huiles essentielles, de stilbènes et d'oxystérols sur des modèles cellulaires de neurodégénérescence in vitro. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2023. Français. NNT: 2023UBFCI003 . tel-04198423

**HAL Id: tel-04198423**

**<https://theses.hal.science/tel-04198423>**

Submitted on 7 Sep 2023

**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 DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Tunis El Manar**

**Spécialité : Sciences Biologiques**

**Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté (ED : ES n°554)**

**Spécialité : Biochimie & Biologie Moléculaire**

Laboratoires :

Laboratoire de Neurophysiologie, Physiopathologie cellulaire et Biomolécules de Valorisation  
LR18ES03, Faculté des Sciences Tunis El Manar, Tunis, Tunisie

Laboratoire Bio-PeroXIL, 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique'  
EA7270 / Inserm, Faculté des Sciences Gabriel, Dijon, France

---

**Evaluation des potentiels neurotrophiques d'huiles essentielles,  
de stilbènes et d'oxystérols sur des modèles cellulaires expérimentaux  
de neurodégénérescence in vitro**

---

**Soutenue publiquement le 07/07/2023**

**Par : Mohamed KSILA**

Devant le jury composé de

<b>Sadok BOUKHCHINA</b>	<b>Professeur, Université Tunis El Manar, Tunisie</b>	<b>Président</b>
<b>Riadh KSOURI</b>	<b>Professeur, Centre de Biotechnologie - Borj Cédria, Tunisie</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Isabelle DELTON</b>	<b>Professeure, INSA Lyon / Université de Lyon, France</b>	<b>Rapporteuse</b>
<b>David VAUDRY</b>	<b>Docteur / HDR, Inserm / Université de Normandie, France</b>	<b>Examineur</b>
<b>Taoufik GHRAIRI</b>	<b>Professeur, Université Tunis El Manar, Tunisie</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Gérard LIZARD</b>	<b>Docteur / HDR, Inserm / Université de Bourgogne, France</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Dominique VERVANDIER-FASSEUR</b>	<b>Maître de Conférence / HDR, Université de Bourgogne, France</b>	<b>Invitée</b>

## **AVANT-PROPOS**

Ce travail de Thèse de Doctorat correspond à une collaboration scientifique entre l'Université Tunis El Manar (Tunis, Tunisie), Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis, Laboratoire de «Neurophysiologie, Physiopathologie Cellulaire et Valorisation des Biomolécules» (LR18ES03, Directrice Prof Olfa MASMOUDI-KOUKI) sous la direction du Pr Taoufik GHRAIRI et l'Université de Bourgogne (Dijon, France) , Faculté des Sciences Gabriel, Laboratoire Bio-PeroxiL « Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique » (EA7270) / Inserm sous la direction du Dr Gérard LIZARD dans le cadre d'une cotutelle internationale de Thèse (France / Tunisie).

Ce travail a été rendu possible grâce aux soutiens financiers du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Tunisie), de l'Université de Tunis El Manar (Tunis, Tunisie), de l'Université de Bourgogne (Dijon, France), d'ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine, Dijon, France) mais surtout du PHC UTIQUE 22G0809 / 47608VJ (Tunisie, Campus France) géré par le Dr. Gérard LIZARD (EA7270 / Univ. Bourgogne / Inserm, Dijon) et le Pr. Taoufik GHRAIRI (LR18ES03 / Univ. Tunis El Manar, Tunis),

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de recherche, il me paraît opportun d'exprimer en quelques lignes la reconnaissance que je dois à tous ceux qui ont contribué, de loin ou de près, à l'élaboration de ce projet de Thèse, qu'ils trouvent ici mes vifs remerciements et ma profonde gratitude.

Qu'il me soit permis de remercier tous les membres de mon jury de Thèse, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir évaluer mon travail :

- Monsieur le Professeur **Riadh KSOURI** (Centre de Biotechnologie de Borj Cédria, Tunisie) et Madame La Professeure **Isabelle DELTON** (Inserm/INSA de Lyon, France) pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette Thèse. Je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de juger ce travail. Votre expertise et vos suggestions sont un honneur pour moi.
- Monsieur le Docteur **David VAUDRY** (Université de Rouen Normandie, France) pour avoir accepté, sans hésitation, de faire partie de mon jury de Thèse au titre d'examinateur. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect, ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour le temps précieux que vous avez consacré à ce travail.
- Monsieur le Professeur **Sadok BOUKHCHINA** (Université de Tunis El Manar, Tunisie) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la Présidence du jury. C'est pour moi un grand honneur de vous voir présider cette Thèse aujourd'hui. Je vous remercie pour l'intérêt et le temps que vous avez consacré à la lecture et le jugement de ce travail.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus sincères et les plus distingués à mes directeurs de Thèse :

- Monsieur **Taoufik GHRAIRI** Professeur, Université de Tunis El Manar (Tunis, Tunisie) pour m'avoir fait confiance depuis l'année 2018 en m'acceptant en Master et en veillant à ce que je continue mon projet de recherche dans de bonnes conditions et pour tous ses conseils et ses encouragements tout au long de ma Thèse. Je vous remercie chaleureusement pour m'avoir encadré durant cette thèse, un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présent. Ses enseignements ont toujours été d'une grande qualité, ils m'ont énormément apporté et resteront un exemple pour moi. Merci de m'avoir soutenu dans les moments les plus

difficiles, pour votre disponibilité, pour avoir pris le temps de discuter avec moi et d'avoir cru en moi. Je me considère chanceux de vous avoir eu à mes côtés lors de cette aventure et soyez assuré de mon attachement.

- Monsieur **Gérard LIZARD**, chercheur Inserm / directeur de laboratoire Université de Bourgogne (Dijon, France) pour m'avoir donné la chance de réaliser une Thèse en cotutelle dans votre laboratoire et pour avoir accepté de m'encadrer. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec vous et je ne peux qu'admirer l'assistance ininterrompue, les valeureux conseils, la confiance et la sympathie que vous m'avez toujours accordée. Vous avez suivi ce travail dans tous ses détails avec beaucoup de patience et de pédagogie et veillé à ce que ce projet de Thèse se déroule dans les meilleures conditions, ce qui m'a donné le courage de persévérer dans mon projet de recherche. Je vous remercie également pour les longues heures de travail sur ce manuscrit. Mon séjour dans votre laboratoire depuis 2020 m'a donné la possibilité d'approfondir mes connaissances et de perfectionner mes compétences en Biochimie, Biologie Cellulaire (cytométrie en flux, microscopie) et Moléculaire. Un grand merci pour les discussions si intéressantes, pour le précieux temps que vous m'avez consacré dans des périodes parfois difficiles. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse tous mes respects à Madame **Olfa MASMOUDI-KOUKI**, Professeure en Neurophysiologie et Directrice du Laboratoire de Neurophysiologie, Physiopathologie Cellulaire et Valorisation des Biomolécules, pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche. Ses compétences professionnelles et ses qualités humaines ont été pour moi un apport inestimable durant la réalisation de ce travail, je lui en suis vivement reconnaissant et je la prie de croire à ma respectueuse estime.

Les résultats présentés dans ce projet Thèse est un travail qui a impliqué plusieurs équipes sur la base de nombreuses collaborations. Je voudrais adresser mes vifs remerciements à tous les personnels et collègues des équipes ci-dessous :

- Département de chimie, Université de Bourgogne, France (Maître de Conférences Émérite, Mme **Dominique VERVANDIER-FASSEUR**) chimiste, pour nous avoir fourni une collection de molécules d'aza-stilbènes dérivés du trans-resvératrol.

- Département de chimie, Université de Metz, France (Pr. **Mohammad SAMADI**) spécialiste de la chimie des stérols, pour nous avoir fourni une collection de molécules d'oxystérols dérivés du cholestérol.
- Plateforme lipidomique UBFC (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne, CHU Dijon – INSERM (Dr **Jean-Paul PAIS de BARROS**, responsable de la plateforme)).
- Plateforme de cytométrie, Université de Bourgogne, Dijon, France (Madame le Dr **Anabelle SEQUEIRA-LE GRAND**, responsable de la plateforme, et Monsieur **Nicolas PERNET**).
- Plateforme DimaCell, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France (Mesdames **Amandine BATAILLE** et **Audrey GEISSLER**).
- Laboratoire Lara-Spiral, Couternon, France (Dr **Michel PROST** (Directeur), Dr **Philippe DURAND**, et Madame **Emmanuelle PROST-CAMUS**).
- Equipe Produits Naturels Analyse et Synthèse, Faculté de Pharmacie de Paris, Université de Paris Cité, Paris, France (Pr **Xavier CACHET** ; Mme **Chouaba BOUZIDI**).

Je ne serais oublié de témoigner de ma profonde gratitude à tous les membres du laboratoire Bio-PeroxiL (EA7270, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, Université de Bourgogne, Dijon, France) **Anne VEJUX (MCU)**, **Stéphane SAVARY (PU)**, **Pierre ANDROLETTI (MCU)**, **Mustapha CHERKAOUI-MALKI (PU)**, **Norbert LATRUFFE (PU Emérite)**, **Vivien PIRES (TR)**, **Catherine GONDCAILLE (IR)**, **Doriane TROMPIER (MCU)** et **Stéphane MANDARD (MCU)**, auprès desquelles, j'ai trouvé l'accueil chaleureux, l'aide, la sympathie et l'assistance dont j'ai eu besoin. Un merci spécial dédié à **Thomas NURY (TR)**, avec lui j'ai beaucoup appris par son expérience, son savoir et son apport technique et scientifique, et à Madame **Nathalie BANCOD** (secrétaire du laboratoire Bio-PeroxiL) pour son temps et son aide pour réaliser une bonne présentation du manuscrit.

Je ne manque pas aussi à remercier mes collègues doctorants / post-doctorants **Khouloud SASSI, Ali TAWBEH, Mounia TAHRI-JOUTEY, Soukaina ESSADEK, Aline YAMMINE, Imen GHZAEIL** pour les moments inoubliables passés ensemble, pour leur spontanéité et pour leur apport amical. Mes remerciements vont aussi aux membres du Laboratoire de neurophysiologie, physiopathologie cellulaire et valorisation des biomolécules de Tunis.

Je voudrais de façon particulière exprimer mes plus vifs remerciements à mes amis et à ma famille en particulier à mes adorables parents **Aïcha** et **Jamel** pour m'avoir entouré, soutenu, conseillé et encouragé depuis toujours.

Mes remerciements ne pourront jamais égaler vos grands cœurs.

Cette Thèse est la vôtre !

Enfin, je veux me remercier aussi pour avoir cru en moi...

*Mohamed KSLA*

## RÉSUMÉ

Mieux connaître le vieillissement et prévenir les maladies liées à l'âge est un challenge en santé publique. Plusieurs types de composés ont été étudiés : a) des dérivés du trans-resvératrol (RSV) produits au laboratoire, des aza-stilbènes, en évaluant leur potentiel cytotoxique comparativement au RSV dans des perspectives anti-tumorales, b) des oxystérols oxydés en C7 (7-cétocholestérol (7KC), 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol (7 $\alpha$ -OHC), 7 $\beta$ -hydroxycholestérol (7 $\beta$ -OHC)) intervenant dans des maladies liées à l'âge ; c) de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol pour évaluer leurs activités cytoprotectrices ; d) des huiles essentielles Méditerranéennes (Thym, Jasmin) pour mieux connaître leurs cibles cellulaires. Dans cette optique, comparativement au RSV, notre étude a d'abord consisté à évaluer les propriétés cytotoxiques et antioxydantes des AZA-STs et leur impact sur le statut mitochondrial en utilisant comme modèle cellulaire des cellules neuronales murines N2a. Les activités antioxydantes des AZA-STs, évaluées par différents techniques (DPPH, FRAP, KRL, PAOT), sont souvent plus importantes que celles du RSV. Les effets cytotoxiques des AZA-STs ont montré une diminution de l'activité estérasiqque associée à une diminution de l'adhérence cellulaire, à des dysfonctions mitochondriales, à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et à des modifications au niveau de la répartition du cycle cellulaire. Les AZA-STs synthétisés se distinguent donc du RSV et comme ce dernier auraient potentiellement des activités anti-tumorales. Par ailleurs, comme une augmentation de dérivés oxydés du cholestérol, notamment d'oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC, 7 $\beta$ -OHC), est souvent observée dans les liquides biologiques et les organes malades de patients atteints de maladies liées à l'âge, la mort cellulaire induite par ces oxystérols a été caractérisée sur cellules N2a à 72h et les activités cytoprotectrices de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol ont été évaluées sur ce modèle. Le 7 $\alpha$ -OHC n'est pas toxique alors que le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC induisent une mort par oxyapoptophagie (incluant des critères de stress OXYdant, d'APOPTose et d'autoPHAGIE) qui est atténuée par l'huile de pépins de grenade et l' $\alpha$ -tocophérol. Par ailleurs, pour prévenir le vieillissement cutané, les huiles essentielles (HEs) sont utilisées en aromathérapie et en médecine traditionnelle. La composition chimique des HEs de jasmin et de thym a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse, leur activité antioxydante a été mesurée avec le test KRL et les activités biologiques de ces HEs ont été abordées sur des kératinocytes humains HaCaT en évaluant leurs effets à plusieurs niveaux : viabilité cellulaire, activité mitochondriale, stress oxydant, métabolisme du cholestérol et des acides gras et mesure du cycle cellulaire. Le profil chromatographique montre trois principaux constituants pour l'HE de jasmin (acétate de benzyle, benzoate de benzyle et linalol (ou linalool)) et pour l'HE de thym (thymol, *p*-cymène et  $\gamma$ -terpinène). Ces HEs peuvent être toxiques (induction de mort cellulaire, stress oxydant) sans modifier le cycle cellulaire à concentrations élevées, à partir de 200  $\mu$ g/mL pour le thym et 400  $\mu$ g/mL pour le jasmin. Ces huiles modifient aussi le métabolisme du cholestérol et des acides gras. L'ensemble de ces travaux apportent de nouvelles informations sur une série de molécules (RSV, AZA-STs, oxystérols) et de mélanges de molécules (huile de pépins de grenade, HEs de thym et de jasmin) impliquées dans différents processus de vieillissement ou utiles pour la prévention du vieillissement.

**Mots clés :** aza-stilbènes, oxystérols, oxyapoptophagie, stress oxydant, maladies liées à l'âge, huile de pépins de grenade / huile essentielle de thym et jasmin.



## ABSTRACT

A better understanding of ageing and the prevention of age-related diseases is a public health challenge. Several types of compounds have been studied: (a) trans-resveratrol (RSV) derivatives produced in the laboratory, aza-stilbenes, for their cytotoxicity compared to RSV in anti-tumour perspectives, (b) C7 oxysterols (7-ketocholesterol (7KC), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OHC), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OHC)) involved in age-related diseases; c) pomegranate seed oil and  $\alpha$ -tocopherol to evaluate their cytoprotective activities; d) Mediterranean essential oils (Thyme, Jasmine) to better understand their biological activity. In this perspective, in comparison with the RSV, our study first consisted in evaluating the cytotoxic and antioxidant properties of AZA-STs and their impact on mitochondrial status using murine N2a neuronal cells. The antioxidant activities of AZA-STs, assessed by different techniques (DPPH, FRAP, KRL, PAOT), are often more important than those of RSV. The cytotoxic effects of AZA-STs have shown a decrease in esterase activity associated with a decrease in cell adhesion, mitochondrial dysfunction, overproduction of reactive oxygen species and changes in cell cycle distribution. The synthesised AZA-STs are therefore distinct from RSV and, like RSV, have potential anti-tumour activities. Furthermore, as an increase in oxidised cholesterol derivatives, especially C7-oxysterols (7KC, 7 $\alpha$ -OHC, 7 $\beta$ -OHC), is often observed in biological fluids and diseased organs of patients with age-related diseases, cell death induced by these oxysterols was characterised in N2a cells at 72 h and the cytoprotective activities of pomegranate seed oil and  $\alpha$ -tocopherol were evaluated in this model. 7 $\alpha$ -OHC is not toxic, while 7KC and 7 $\beta$ -OHC induce oxyapoptophagy (including OXYdant stress, APOPTOsis and autoPHAGY criteria) which is attenuated by pomegranate seed oil and  $\alpha$ -tocopherol. Furthermore, to prevent skin ageing, essential oils (EOs) are used in aromatherapy and traditional medicine. The chemical composition of jasmine and thyme EOs was determined by gas chromatography-mass spectrometry, their antioxidant activity was measured with the KRL assay and the biological activities of these EOs were addressed on human HaCaT keratinocytes by evaluating their effects at several levels: cell viability, mitochondrial activity, oxidative stress, cholesterol and fatty acid metabolism and cell cycle measurement. The chromatographic profile shows three main constituents for jasmine EO (benzyl acetate, benzyl benzoate and linalool) and for thyme EO (thymol, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene). These EOs can be toxic (induction of cell death, oxidative stress) without modifying the cell cycle distribution at high concentrations, from 200  $\mu$ g/mL for thyme and 400  $\mu$ g/mL for jasmine. These oils also modify the metabolic pathway of cholesterol and fatty acids. All of this work provides new information on a series of molecules (RSV, AZA-STs, oxysterols) and mixtures of molecules (pomegranate seed oil, thyme and jasmine EOs) involved in various ageing processes or useful for the prevention of ageing.

**Key words:** age-related diseases, aza-stilbenes, oxysterols, oxidative stress, oxyapoptophagy, pomegranate seed oil / essential oils

## TRAVAUX SCIENTIFIQUES

### Publications de Thèse

- **Ksila M**, Vejux A, Prost-Camus E, Durand P, Ghzaïel I, Nury T, Duprey D, Meziane S, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N, Ghraïri T, Prost M, Lizard G, Vervandier-Fasseur D. Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. **Molecules**. 2022 ; 27(15): 4713. <https://doi.org/10.3390/molecules27154713>
- **Mohamed Ksila**, Imen Ghzaïel, Aline Yammine, Thomas Nury, Anne Vejux, Dominique Vervandier-Fasseur, Norbert Latruffe, Emmanuelle Prost-Camus, Smail Meziane, Olfa Masmoudi-Kouki, Amira Zarrouk, Taoufik Ghraïri, Gérard Lizard. Analysis of the mitochondrial status of murine neuronal N2a cells treated with resveratrol and synthetic isomeric resveratrol analogs : aza-stilbenes. **Molecular Nutrition and Mitochondria**. 2022 Oct ; (7) :195-211. [doi.org/10.1016/B978-0-323-90256-4.00023](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90256-4.00023)
- **Ksila M**, Ghzaïel I, Pires V, Ghraïri T, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N, Vervandier-Fasseur D, Vejux A, Lizard G. Characterization of Cell Death Induced by Imine Analogs of Trans-Resveratrol: Induction of Mitochondrial Dysfunction and Overproduction of Reactive Oxygen Species Leading to, or Not, Apoptosis without the Increase in the S-Phase of the Cell Cycle. **Molecules**. 2023 ; 28(7) : 3178. <https://doi.org/10.3390/molecules28073178>
- **Mohamed Ksila**, Imen Ghzaïel, Khoulood Sassi, Amira Zarrouk, Valerio Leoni, Giuseppe Poli , Leila Rezig, Vivien Pires, Smail Meziane, Atanas G. Atanasov, Sonia Hammami, Mohamed Hammami, Olfa Masmoudi-Kouki, Oumaima Hamdi, Pierre Jouanny, Mohammad Samadi, Anne Vejux , Taoufik Ghraïri, Gérard Lizard. Therapeutic applications of oxysterols and derivatives in age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, and cancer. **Oxysterols and Phytosterols in Human Health, Springer: Advances in Experimental Medecine and Biology**. 2023

## Publications de recherche associées

- Ghzaïel I, Sassi K, Zarrouk A, Nury T, **Ksila M**, Leoni V, Bouhaouala-Zahar B, Hammami S, Hammami M, Mackrill JJ, Samadi M, Ghraïri T, Vejux A, Lizard G. 7-Ketocholesterol : Effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2021 Sep ;212 :105939. doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105939. Epub 2021 Jun 9. PMID : 34118414 ; PMCID : PMC8188774.
- Rezig L, Ghzaïel I, **Ksila M**, Yammine A, Nury T, Zarrouk A, Samadi M, Chouaïbi M, Vejux A, Lizard G. Cytoprotective activities of representative nutrients from the Mediterranean diet and of Mediterranean oils against 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cytotoxicity: Application to age-related diseases and civilization diseases. **Steroids.** 2022 Nov ;187 :109093. doi: 10.1016/j.steroids.2022.109093. Epub 2022 Aug 24. PMID : 36029811.
- Ghzaïel I, Zarrouk A, Essadek S, Martine L, Hammouda S, Yammine A, **Ksila M**, Nury T, Meddeb W , Tahri Joutey M, Mihoubi W , Caccia K , Leoni V, Samadi M, Acar N , Andreoletti P , Hammami S , Ghraïri T , Vejux A , Hammami M, Lizard G. Protective Effects of Milk Thistle (*Silybum marianum*) Seed Oil and tocopherol against 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced Peroxisomal Alterations in Murine C2C12 Myoblasts: Nutritional Insights Associated with the Concept of Pexotherapy. **Steroids.** 2022 : 183, 109032. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.10903>.
- Brahmi F, Vejux A, Ghzaïel I, **Ksila M**, Zarrouk A, Ghraïri T, Essadek S, Mandard S, Leoni V, Poli G, Vervandier-Fasseur D, Kharoubi O, El Midaoui A, Atanasov AG, Meziane S, Latruffe N, Nasser B, Bouhaouala-Zahar B, Masmoudi-Kouki O, Madani K, Boulekbache-Makhlouf L, Lizard G. Role of Diet and Nutrients in SARS-CoV-2 Infection: Incidence on Oxidative Stress, Inflammatory Status and Viral Production.

Nutrients. 2022 May 25 ;14(11):2194. doi: 10.3390/nu14112194. PMID : 35683996 ;  
PMCID : PMC9182601.

- Ghzaiel I, Sassi K, Zarrouk A, Ghosh S, Dias I, Nury T, **Ksila M**, Essadek S, Tahri Joutey M, Brahmi F, Mihoubi W, Rup-Jacques S, Samadi M, Rezig L, Meziane S, Ghrair T, Masmoudi-Kouki O, Hammami S, Nasser B, Hammami M, Wang Y, Griffiths W , Vejux, Lizard G. Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: food and biomedical. **Redox Experimental Medicine**. 2022. R40-R56. <https://doi.org/10.1530/REM-22-0005>.
- Kessas K, Chouari Z, Ghzaiel I, Zarrouk A, **Ksila M**, Ghrairi T, El Midaoui A, Lizard G, Kharoubi O. Role of Bioactive Compounds in the Regulation of Mitochondrial Dysfunctions in Brain and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 2022 Jan 13 ;11(2) :257. doi: 10.3390/cells11020257. PMID : 35053373 ; PMCID : PMC8773907.
- El Midaoui A, Ghzaiel I, Vervandier-Fasseur D, **Ksila M**, Zarrouk A, Nury T, Khallouki F, El Hessni A, Ibrahim SO, Latruffe N, Couture R, Kharoubi O, Brahmi F, Hammami S, Masmoudi-Kouki O, Hammami M, Ghrairi T, Vejux A, Lizard G. Saffron (*Crocus sativus* L.) : A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases. **Nutrients**. 2022 Jan 29 ;14(3) :597. doi : 10.3390/nu14030597. PMID : 35276955 ; PMCID : PMC8839854.

## Publication électronique

- Ghzaiel I, **Ksila M**, Latruffe N, Vejux A, Vervandier-Fasseur D, Lizard G. Interest of polyphenols in the prevention of age-related diseases and in regenerative medicine. *Science & Wine*, 2022. URL : <https://www.ciencia-e-vinho.com/2022/09/18/interest-of-polyphenols-in-the-prevention-of-age-related-diseases-and-in-regenerative-medicine>.

## Communications orales et sur panneaux

### ➤ Communications orales

- **Mohamed KSILA**, Olfa MASMOUDI-KOUKI, Gérard LIZARD, Taoufik GHRAIRI. In vitro evaluation of the effect of lemon essential oils on 7-ketocholesterol-induced cytotoxicity. **European Network for Oxysterol Research (ENOR) 2021. 10<sup>th</sup> ENOR Symposium – Web Meeting; September 16 - 17<sup>th</sup>.**
- **Mohamed KSILA**, Dominique VERVANDIER-FASSEUR, Thomas NURY, Anne VEJUX, Norbert LATRUFFE, Olfa MASMOUDI, Taoufik GHRAIRI, Gérard LIZARD. Characterization of cell death on murine neuronal N2a cells treated with resveratrol and synthetic isomeric resveratrol analogues: aza-stilbenes. **8<sup>th</sup> Mediterranean Neuroscience Society (MNS) Conference, May 29 – June 2, 2022, Dubrovnik-Croatia**

### ➤ Communications sur panneaux

- **Mohamed KSILA**, Gérard LIZARD, Olfa MASMOUDI-KOUKI, Taoufik GHRAIRI. Effects of lemon and myrtle essential oils in neurodegenerative diseases». **4<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry & Microbiology Applied Technologies (BMAT 2021), November 5-7<sup>th</sup>, Hammamet-Tunisia.**
- **Mohamed KSILA**, Amel ABIDI, Gérard LIZARD, Olfa MASMOUDI-KOUKI, Taoufik GHRAIRI. Evaluation of the Cytotoxic and Antioxidant Activities of Essential Oils and Imine Analogs of Trans-Resveratrol *in vitro*. **5<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry & Microbiology Applied Technologies (BMAT 2022), November 4-6<sup>th</sup>, Hammamet-Tunisia.**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	
<b>RÉSUMÉ</b> .....	
<b>ABSTRACT</b> .....	
<b>TRAVAUX SCIENTIFIQUES</b> .....	
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>1</b>
I. Vieillesse et espérance de vie en bonne santé .....	2
II. Maladies liées à l'âge .....	4
1. Cancers associés au vieillissement .....	5
2. Maladies cardiovasculaires.....	5
3. Maladies oculaires .....	6
3.1. Presbytie.....	6
3.2. Cataracte .....	7
3.3. Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	7
3.4. Glaucome .....	7
3.5. Maladies neurodégénératives liées à l'âge : Alzheimer et Parkinson.....	8
3.6. Sarcopénie : dégénérescence du muscle squelettique.....	10
3.7. Ostéoporose .....	11
3.8. Vieillesse cutané .....	11
3.9. Maladie pulmonaire .....	12
3.10. Maladies génétiques associées à un vieillissement accéléré.....	13

3.10.1. Progéria .....	13
3.10.2. Syndrome de Laron .....	13
4. Implication de la génétique et de l'épigénétique dans le vieillissement.....	14
4.1. Aspect génétique du vieillissement.....	14
4.2. Aspect épigénétique du vieillissement.....	17
III. Implication du stress oxydant dans le vieillissement .....	18
1. Stress oxydant.....	18
2. Modifications moléculaires .....	19
2.1. Peroxydation lipidique .....	20
2.2. Carbonylation protéique.....	22
2.3. Modifications des acides nucléiques.....	23
3. Dysfonctionnement des organites.....	24
3.1. Mitochondries .....	24
3.2. Peroxysomes .....	26
3.3. Réticulum endoplasmique.....	27
3.4. Lysosomes .....	28
IV. Oxystérols : Dérivés issus de l'oxydation du cholestérol .....	29
1. Biogenèse des oxystérols.....	29
1.1. Auto-oxydation .....	29
1.2. Voies enzymatiques .....	30
2. Activités biologiques des oxystérols .....	32
2.1. Activités pro-oxydantes .....	32
2.2. Activités pro-inflammatoires .....	32
2.3. Induction de la mort cellulaire .....	33

2.3.1. Apoptose .....	33
2.3.2. Nécrose et nécroptose .....	36
2.3.3. Autophagie .....	38
2.3.4. Sénescence .....	41
2.3.5. Oxyapoptophagie (« Oxiapoptophagy ») .....	43
V. Importance du régime alimentaire pour la prévention du vieillissement .....	45
1. Régime méditerranéen et impact sur le vieillissement .....	45
2. Polyphénols associés au régime méditerranéen.....	46
2.1. Origine, structure et classification des polyphénols .....	46
2.2. Métabolisme.....	47
2.3. Activités et propriétés biologiques .....	50
2.4. Resvératrol .....	53
VI. Nutrithérapie .....	55
VII. Aromathérapie et huiles essentielles.....	56
1. Définition.....	56
2. Sources et procédés d'extraction des huiles essentielles .....	57
2.1. Hydrodistillation .....	57
2.2. Extraction par solvants.....	58
2.3. Extraction à froid ou pression mécanique.....	59
2.4. Extraction par le CO <sub>2</sub> .....	59
2.5. Enfleurage .....	60
3. Composition chimique des huiles essentielles.....	61
3.1. Composés terpéniques (terpènes et terpénoïdes) .....	62
a. Les monoterpènes .....	63



b. Les sesquiterpènes .....	63
3.2. Composés aromatiques dérivés de phénylpropane (Phénols) .....	64
3.3. Autres composés d'origines diverses .....	65
4. Activités biologiques .....	65
4.1. Activités antioxydantes .....	65
4.2. Activités neuroprotectrices .....	66
4.3. Activités antimicrobiennes .....	68
4.4. Activités anti-inflammatoires.....	68
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>70</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>72</b>
1. Préparation des molécules .....	73
1.1. Oxystérols .....	73
1.2. Resvératrol .....	74
1.3. Aza-stilbènes.....	74
1.4. $\alpha$ -tocophérol.....	75
1.5. Huiles essentielles.....	75
2. Culture et traitement des cellules.....	75
2.1. Matériel biologique : lignées de neuroblastome de souris (N2a) et de kératinocytes humains (HaCaT).....	75
2.2. Culture cellulaire.....	76
3. Evaluation de la viabilité et de l'adhérence cellulaire.....	76
3.1. Mesure de l'activité estérase : test FDA (Fluorescéine Diacétate).....	76
3.2. Evaluation de l'adhérence cellulaire : test Sulforhodamine 101 (SR101).....	77
3.3. Evaluation de la confluence cellulaire : coloration au Crystal Violet .....	77

---

3.4. Mesure par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium .....	77
4. Caractérisation et évaluation de la mort cellulaire .....	78
4.1. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase.....	78
4.2. Caractérisation et quantification de l'apoptose par coloration au Hoechst 33342 et au May-Grünwald-Giemsa .....	79
4.2.1. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 : application à l'apoptose .....	79
4.2.2. Analyse de l'aspect des noyaux et du cytoplasme après coloration au May-Grünwald-Giemsa : application à l'apoptose, la nécrose et l'autophagie.....	79
4.3. Evaluation de de l'apoptose par cytométrie en flux par mesure de l'activation des caspases 3/7.....	80
4.4. Caractérisation de l'autophagie par coloration des vacuoles autophagiques.....	80
4.5. Mesure du stress oxydant : mesure par cytométrie en flux des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le fluorochrome dihydroethidium (DHE) .....	81
5. Evaluation du statut mitochondrial.....	82
5.1. Mesure par cytométrie en flux du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par coloration au 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC <sub>6</sub> (3)) .....	82
5.2. Evaluation de la production des espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial par coloration au MitoSOX Red.....	83
6. Mesure du cycle cellulaire.....	84
7. Analyse protéique par Western Blot.....	85
7.1. Extraction et dosage des protéines .....	85
7.2. Préparation des échantillons .....	86
7.3. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	86
7.4. Migration des protéines .....	87
7.5. Transfert des protéines.....	88

8. Mesure de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des aza-stilbènes.....	88
8.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) .....	89
8.2. Test d'évaluation de l'activité réductrice d'antioxydants contre les ions de fer : FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power) .....	90
8.3. Test KRL (Kit Radicaux Libres) .....	91
8.4. PAOT (Pouvoir Antioxydant Total) .....	93
9. Analyse du profil des acides gras .....	93
10. Analyse des phytostérols .....	94
10.1. Isolement de la fraction insaponifiable .....	94
10.2. Silylation de la fraction insaponifiable .....	94
10.3. Identification des stérols .....	94
11. Analyse des tocophérols .....	95
12. Dosage des oxystérols cellulaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	95
12.1. Saponification des acides gras .....	95
12.2. Extraction et dérivation des oxystérols plasmatiques .....	95
12.3. Analyse des oxystérols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	96
12.4. Caractérisation des constituants des huiles essentielles.....	96
13. Analyses statistiques.....	96
<b>RESULTATS .....</b>	<b>97</b>
I. Caractérisation des activités des AZA-STs comparativement au trans-resvératrol (RSV) ..	98
1. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol (RSV) sur la morphologie cellulaire (microscopie à contraste de phase).....	98
2. Evaluation de la toxicité des AZA-STs et du trans-resvératrol sur les cellules N2a.....	99

---

2.1. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la viabilité cellulaire par mesure de l'activité estérase (test FDA) .....	99
2.2. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur l'adhésion cellulaire (test Sulforhodamine 101) .....	102
2.3. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la confluence cellulaire (test Crystal Violet) .....	104
3. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la perméabilité de la membrane plasmique : évaluation par coloration à l'iodure de propidium .....	107
4. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial : évaluation par coloration au DiOC <sub>6</sub> (3) .....	108
5. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) : évaluation par coloration au dihydroéthidium .....	110
6. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) au niveau mitochondrial : évaluation par coloration au MitoSOX Red.....	111
7. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur l'induction d'apoptose : Caractérisation de la morphologie nucléaire après coloration au Hoechst 33342.....	113
8. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur le cycle cellulaire : analyse par cytométrie en flux .....	115
9. Evaluation des activités antioxydantes des AZA-ST et du <i>trans</i> -resvératrol.....	119
II. Etude de la toxicité d'oxystérols oxydés en C7 (7-cétocholestérol, 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, 7 $\beta$ -hydroxycholestérol) sur cellules N2a.....	122
1. Détermination des concentrations cytotoxiques des oxystérols oxydés sur le carbone 7 (C7).....	122
2. Effet des oxystérols sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) : évaluation par coloration au DiOC <sub>6</sub> (3).....	124
3. Caractérisation de l'oxyapoptophagie (« oxiaoptophagy »).....	125
3.1 Quantification du stress oxydant : mesure de la surproduction des espèces réactives de l'oxygène par cytométrie en flux après coloration à la dihydroéthidine.....	125

3.2. Caractérisation de la mort cellulaire : analyse de l'apoptose par coloration au May-Grünwald-Giemsa et mesure de l'activation des caspases 3/7 par cytométrie en flux par la technique FLICA (Fluorescent Inhibitor of Caspases) .....	126
3.3. Caractérisation de l'autophagie : analyse par microscopie à fluorescence et cytométrie en flux après coloration des vésicules d'autophagie, et analyse par western blot .....	129
4. Evaluation des effets cytoprotecteurs de l' $\alpha$ -tocophérol et d'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol .....	131
4.1. Composition en acides gras, phytostérols et tocophérols d'huile de pépins de grenade .....	131
4.1.1. Composition en acides gras.....	131
4.1.2. Composition en cholestérol et phytostérols .....	133
4.1.3. Quantification et identification des tocophérols .....	133
4.2. Evaluation de la toxicité de l'huile de pépins de grenade : test FDA .....	134
4.3. Evaluation de la cytoprotection de l'huile de pépins de grenade sur la toxicité du 7-cétocholestérol : test FDA .....	135
4.4. Evaluation de la cytoprotection de l'huile de pépins de grenade sur la toxicité du 7-cétocholestérol : test SR101 .....	136
4.5. Evaluation des effets de l'huile de pépins de grenade sur la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par le 7-cétocholestérol : évaluation par cytométrie en flux après coloration à la dihydroéthidine .....	137
4.6. Analyse des effets de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol sur l'autophagie induite par le 7-cétocholestérol.....	138
III. Caractérisation des activités de deux huiles essentielles méditerranéennes (jasmin, thym) sur des kératinocytes humains HaCaT établis en lignée .....	139
1. Caractérisation des huiles essentielles de Jasmin et de Thym.....	139
1.1. Composition chimique de l'huile essentielle de jasmin.....	139

1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de thym .....	140
1.3. Propriété antioxydante des huiles essentielles de jasmin et de thym : analyse par le test KRL.....	140
2. Etude de la toxicité des huiles essentielles de jasmin et de thym sur cellules HaCaT .....	141
3. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur la morphologie des cellules HaCaT .....	142
4. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire mitochondrial : évaluation par coloration au DiOC <sub>6</sub> (3).....	143
5. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le stress oxydant .....	144
5.1. Effet des huiles essentielles du jasmin et de thym sur la production des espèces réactives de l'oxygène .....	144
5.2. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur la peroxydation lipidique : mesure des concentrations intracellulaires de 7-cétocholestérol et 7β-hydroxycholestérol .....	145
6. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le cycle cellulaire.....	147
7. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le métabolisme des acides gras des cellules HaCaT.....	148
8. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le métabolisme du cholestérol des cellules HaCaT .....	150
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>152</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>161</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>168</b>
<b>ANNEXES : .....</b>	<b>214</b>
Annexe 1 : Etapes pré-analytiques d'analyse des acides gras.....	215
Annexe 2 : Etapes pré-analytiques d'analyse des oxystérols .....	217
Annexe 3 : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de jasmin .....	218

Annexe 4 : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de thym..... 219

Annexe 5 : Test KRL ..... 220

Annexe 6 : Publications associées aux travaux de thèse ..... 223

Publication 1 :

**Ksila M**, Vejux A, Prost-Camus E, Durand P, Ghzaïel I, Nury T, Duprey D, Meziane S, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N, Ghraïri T, Prost M, Lizard G, Vervandier-Fasseur D. Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. *Molecules*. 2022 ; 27(15): 4713..... 223

Publication 2 :

**Ksila M**, Ghzaïel I, Pires V, Ghraïri T, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N, Vervandier-Fasseur D, Vejux A, Lizard G. Characterization of Cell Death Induced by Imine Analogs of Trans-Resveratrol: Induction of Mitochondrial Dysfunction and Overproduction of Reactive Oxygen Species Leading to, or Not, Apoptosis without the Increase in the S-Phase of the Cell Cycle. *Molecules*. 2023 ; 28(7) : 3178. .... 239

Publication 3 :

**Mohamed Ksila**, Imen Ghzaïel, Aline Yammine, Thomas Nury, Anne Vejux, Dominique Vervandier-Fasseur, Norbert Latruffe, Emmanuelle Prost-Camus, Smail Meziane, Olfa Masmoudi-Kouki, Amira Zarrouk, Taoufik Ghraïri, Gérard Lizard. Analysis of the mitochondrial status of murine neuronal N2a cells treated with resveratrol and synthetic isomeric resveratrol analogs : aza-stilbenes. *Molecular Nutrition and Mitochondria*. 2022 Oct ; (7) :195-211. .... 259

Publication 4 :

**Mohamed Ksila**, Imen Ghzaïel, Khoulood Sassi, Amira Zarrouk, Valerio Leoni, Giuseppe Poli, Leila Rezig, Vivien Pires, Smail Meziane, Atanas G. Atanasov, Sonia Hammami, Mohamed Hammami, Olfa Masmoudi-Kouki, Oumaima Hamdi, Pierre Jouanny, Mohammad Samadi, Anne Vejux, Taoufik Ghraïri, Gérard Lizard. Therapeutic applications of oxysterols and derivatives in age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, and cancer. *Oxysterols and Phytosterols in Human Health*, Springer : Advances in Experimental Medicine and Biology. 2023 .....279

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Espérance de vie à la naissance entre 1950 et 2022 en France.....	2
<b>Figure 2:</b> Espérance de vie à la naissance dans les pays du Nord de l'Afrique .....	3
<b>Figure 3:</b> Structure physiologique du cerveau et de neurones .....	9
<b>Figure 4:</b> Aspect morphologique de la peau d'une personne âgée .....	12
<b>Figure 5:</b> Stress oxydant résultant d'un déséquilibre entre les ROS et les antioxydants .....	18
<b>Figure 6:</b> Structure chimique des principaux produits de la peroxydation lipidique (aldéhydes) .....	20
<b>Figure 7:</b> Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et produits terminaux .....	21
<b>Figure 8:</b> Modifications de l'ADN suite à un stress oxydant .....	24
<b>Figure 9:</b> Formation d'oxystérols par auto-oxydation du cholestérol.....	30
<b>Figure 10:</b> Exemples d'enzymes impliquées dans la formation d'oxystérols.....	31
<b>Figure 11:</b> Séquences cellulaires associées à l'apoptose .....	33
<b>Figure 12:</b> Schéma de mort cellulaire par apoptose : voie intrinsèque et voie extrinsèque ....	35
<b>Figure 13:</b> Cascade de caspases impliquées dans l'apoptose .....	36
<b>Figure 14:</b> Schéma de la nécroptose.....	37
<b>Figure 15:</b> Schéma des différents types d'autophagie : micro-autophagie, macro-autophagie et autophagie médiée par des protéines chaperonnes.....	38
<b>Figure 16:</b> Déroulement des différentes étapes de l'autophagie (macro-autophagie).....	41
<b>Figure 17:</b> Voies de signalisation associées à la toxicité du 7-cétocholestérol.....	44
<b>Figure 18:</b> Structure chimique du phénol .....	46
<b>Figure 19:</b> Classification des polyphénols.....	47
<b>Figure 20:</b> Principales voies de dégradation de l'acide férulique, de l'acide caféique et de l'acide p-coumarique.....	49
<b>Figure 21:</b> ERO et ERA neutralisées par des polyphénols .....	51
<b>Figure 22:</b> Effet anti-inflammatoire des polyphénols .....	52
<b>Figure 23 :</b> Structure chimique du resvératrol.....	53
<b>Figure 24:</b> Effets du trans-resvératrol sur les voies de transduction du signal cellulaire.....	54
<b>Figure 25:</b> Structure chimique du resvératrol, des aza-stilbènes (AZA-ST) et des azo-stilbènes (AZO-ST) .....	56
<b>Figure 26:</b> Principe de la technique d'hydrodistillation.....	58
<b>Figure 27:</b> Montage de l'extraction à froid.....	59
<b>Figure 28:</b> Principe d'extraction des HEs par le CO <sub>2</sub> supercritique .....	60



<b>Figure 29:</b> Schéma de l'enfleurage à froid.....	61
<b>Figure 30:</b> Structure chimique des principaux groupes des huiles essentielles.....	62
<b>Figure 31:</b> Structure chimique d'un isoprène .....	62
<b>Figure 32:</b> Structure chimique de quelques composés terpéniques des huiles essentielles ....	63
<b>Figure 33:</b> Structure chimiques de quelques composés aromatiques des huiles essentielles..	65
<b>Figure 34:</b> Mécanisme antioxydant des HEs.....	66
<b>Figure 35:</b> Synthèse neuronale et clivage enzymatique de l'acétylcholine (ACh) par l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) .....	67
<b>Figure 36:</b> Structure chimique de l'Iodure de Propidium .....	77
<b>Figure 37:</b> Schéma d'oxydation de la Dihydroethidine (DHE) en Ethidium.....	81
<b>Figure 38:</b> Structure chimique du 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide (DiOC <sub>6</sub> (3)) .....	82
<b>Figure 39:</b> Schéma d'utilisation du MitoSOX Red pour la détection d'ERO mitochondriaux par cytométrie en flux .....	83
<b>Figure 40:</b> Schéma représentant le pic Sub-G1 par rapport aux autres phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M), analyse par cytométrie en flux .....	84
<b>Figure 41:</b> Structure chimique du radical synthétique radicalaire DPPH et du DPPH-H (non radicalaire).....	89
<b>Figure 42:</b> Principe de la technique FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power).....	90
<b>Figure 43:</b> Principe du test KRL (Kit Radicaux Libres ; Société Lara-Spiral, Couternon, France).....	92
<b>Figure 44:</b> Analyse morphologique des cellules neuronales murines N2a par microscopie à contraste de phase.....	99
<b>Figure 45:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la viabilité cellulaire. ...	102
<b>Figure 46:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur l'adhésion cellulaire. ...	104
<b>Figure 47:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la confluence cellulaire. ...	106
<b>Figure 48:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la perméabilité de la membrane plasmique. Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a-g et du RSV sur les dommages de la membrane plasmique et la viabilité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium (IP). .....	107
<b>Figure 49:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a-g et du RSV sur le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) par coloration au DiOC <sub>6</sub> (3)..	110

<b>Figure 50:</b> Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a-g et du RSV sur la production d'ERO par coloration au dihydroéthidium (DHE). .....	111
<b>Figure 51:</b> Mesure de la production d'ERO incluant l'anion superoxyde au niveau mitochondrial sur des cellules cultivées en présence de RSV et AZA-STs (1a-1g). Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a-g et du RSV sur la production d'ERO et $O_2^{\cdot-}$ par coloration au MitoSOX Red. ....	113
<b>Figure 52:</b> Quantification des cellules apoptotiques par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 : Effets des AZA-STs et du RSV sur l'induction d'apoptose...	114
<b>Figure 53:</b> Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire: Effets des aza-stilbènes et du trans-resvératrol sur le cycle cellulaire.....	117
<b>Figure 54:</b> Evaluation de l'effet des AZA-STs et du RSV sur la répartition des cellules en SubG1 et dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M).....	118
<b>Figure 55:</b> Quantification de l'activité antioxydante du RSV et des AZA-STs par test KRL....	120
<b>Figure 56:</b> Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur l'adhésion cellulaire. Evaluation par le test Sulforhodamine (SR 101) des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur l'adhésion cellulaire. ....	122
<b>Figure 57:</b> Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Evaluation par cytométrie en flux des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur $\Delta\Psi_m$ après coloration au DiOC <sub>6</sub> (3)..	124
<b>Figure 58:</b> Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Evaluation par cytométrie en flux des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC) sur la production d'ERO par coloration avec la dihydroéthidine (DHE). ....	125
<b>Figure 59:</b> Caractérisation de la mort cellulaire par apoptose induite par les oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC).....	127
<b>Figure 60:</b> Quantification des cellules caspases 3/7 positive par la technique FLICA en cytométrie en flux.....	128
<b>Figure 61:</b> Analyse de l'autophagie sur cellules N2a traitées par les oxystérols oxydés en C7 (7KC, $7\alpha$ -OHC et $7\beta$ -OHC). ....	131
<b>Figure 62:</b> Effets de l'huile de pépins de grenade sur la viabilité cellulaire. ....	134
<b>Figure 63:</b> Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7-cétocholestérol (25 $\mu$ M et 50 $\mu$ M) sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol. Evaluation par le test FDA .....	135

---

<b>Figure 64:</b> Evaluation de l'adhésion cellulaire en présence de 7-cétocholestérol (25 $\mu$ M et 50 $\mu$ M) sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol. Evaluation par le test SR101. ....	136
<b>Figure 65:</b> Mesure de la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) en présence de 7-cétocholestérol sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol. Test de coloration au dihydroéthidium (DHE).....	137
<b>Figure 66:</b> Analyse des effets de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol sur l'autophagie induite par le 7-cétocholestérol sur cellules N2a : analyse par western blot.....	139
<b>Figure 67:</b> Quantification de l'activité antioxydante des HEs de jasmin et de thym par test KRL .....	140
<b>Figure 68:</b> Effets des HEs sur la viabilité des cellules HaCaT : test SR101 et FDA .....	142
<b>Figure 69:</b> Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules HaCaT. ....	143
<b>Figure 70:</b> Effets des HEs de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Evaluation par cytométrie en flux des effets des HEs de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ), coloration au DiOC <sub>6</sub> (3). ....	144
<b>Figure 71:</b> Effets des HEs de jasmin et de thym sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Evaluation par cytométrie en flux des effets des HEs de jasmin et de thym sur la production d'ERO par coloration à la dihydroéthidine (DHE). ....	145
<b>Figure 72:</b> Mesure de la peroxydation lipidique par quantification des concentrations intracellulaires de 7KC et 7 $\beta$ -OHC sur cellules HaCaT .....	146
<b>Figure 73 :</b> Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire : Effets des HEs sur le cycle cellulaire .....	147
<b>Figure 74:</b> Voies de biosynthèse du cholestérol et de ses précurseurs (lanostérol et lathostérol) dans les cellules HaCaT traitées ou non par les huiles essentielles de jasmin et de thym. ....	151
<b>Figure 75:</b> Effets des AZA-STs sur cellules N2a.....	163
<b>Figure 76:</b> Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC, 7 $\beta$ -OHC) sur cellules neuronales N2a après 72h de traitement. Cytoprotection par l'huile de pépins de grenade et par l' $\alpha$ -tocophérol. ....	165
<b>Figure 77:</b> Effets des huiles essentielles (HEs) de jasmin et de thym sur des kératinocytes humains (HaCaT) .....	167

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Représentation des oxystérols oxydés en C7 .....	73
<b>Tableau 2:</b> Principales caractéristiques chimiques du trans-resvératrol et des Aza-stilbènes	74
<b>Tableau 3:</b> Composition des différents gels d'acrylamide .....	87
<b>Tableau 4:</b> Valeurs des IC50 des AZA-STs (1a-1g) et du RSV obtenues avec le test FDA (viabilité cellulaire et mesure de l'activité estérase), par le test SR101 (adhésion cellulaire) et par le test Crystal violet (confluence cellulaire).....	106
<b>Tableau 5:</b> Répartition des cellules N2a dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M) et quantification des cellules en SubG1 après traitement par les aza-stilbènes ou par le trans-resvératrol.....	119
<b>Tableau 6:</b> Evaluation des activités antioxydantes de RSV et des AZA-STs par différents tests (KRL, DPPH, FRAP et PAOT).....	121
<b>Tableau 7:</b> Valeurs des IC50 des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) : utilisation du test SR101 .....	123
<b>Tableau 8:</b> Composition en acide gras de l'huile de pépins de grenade.....	132
<b>Tableau 9:</b> Composition en cholestérol et en phytostérols de l'huile de pépins de grenade..	133
<b>Tableau 10:</b> Teneur en tocophérols de l'huile de pépins de grenade.....	134
<b>Tableau 11:</b> Répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M) et quantification des cellules en SubG1 après traitement par les HEs de jasmin et de thym .....	148
<b>Tableau 12:</b> Profils des acides gras dans les cellules HaCaT traitées par les huiles essentielles de jasmin et de thym.....	149

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**\*NO** : Monoxyde d'azote

**11 $\beta$ -HSD** : 11 $\beta$ -Hydroxystéroïde déhydrogénase

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet

**24(S)-OHC** : 24(S)-Hydroxycholestérol

**25-OHC** : 25-Hydroxycholestérol

**3-MA** : 3-Méthyladénine

**4-HNE** : 4-Hydroxy-2-nonal

**4 $\alpha$ -OHC** : 4 $\alpha$ -Hydroxycholestérol

**6 $\alpha$ -OHC** : 6 $\alpha$ -Hydroxycholestérol

**6 $\beta$ -OHC** : 6 $\beta$ -Hydroxycholestérol

**7KC** : 7-Cétocholestérol

**7 $\alpha$ -OHC** : 7 $\alpha$ -Hydroxycholestérol

**7 $\beta$ -OHC** : 7 $\beta$ -Hydroxycholestérol

**8-OHdG** : 8-Hydroxy-2' désoxyguanosine

**8-OHG** : 8-Hydroxyguanosine

**ABCD3** : ATP-Binding Cassette transporter D3

**ACN** : Acétonitrile

**ACOX1** : Acyl Co-A Oxydase 1

**AGMI** : Acide gras monoinsaturé

**AGPI** : Acide gras polyinsaturé

**AGTLC** : Acide Gras à Très Longue Chaîne

**AIF** : Apoptosis-Inducing Factor

**AMP** : Adénosine monophosphate

**AMPK** : Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase

**ANT** : Adénine Nucléotide Translocase

**APOE** : Apolipoprotein E

**APP** : Amyloid Precursor Protein

**ATF6** : Activating Transcription Factor 6

**Atgs** : Autophagy domain

**ATP** : Adénosine triphosphate

**AZA-ST** : aza-stilbène

**AZO-ST** : azo-stilbène

**A $\beta$**  : Amyloïde  $\beta$

**BHE** : Barrière hématoencéphalique

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

**BiP** : Binding Protein

**BNIP 3** : Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3

**BSA** : Bovine Serum Albumin

**BSTFA** : Bbis-Triméthylsilyl-Trifluoroacétamide

**Ca<sup>2+</sup>** : Ion calcium

**CAT** : Catalase

**CETP** : Cholesteryl Ester Transfer Protein

**CH25H** : Cholestérol 25-Hydrolase

**CHOP** : C/EBP Homologous Protein

**CPG-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**CPT1A** : Carnitine Palmitoyl Transférase 1A

- CyP D** : Cyclophiline D
- CYP** : Cytochrome P450 (enzymes)
- DHA** : Acide docosahexaénoïque
- DHE** : Dihydroethidium
- DiOC<sub>6</sub>(3)** : 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide
- DIPEA** : N, N-Diisopropylethylamine
- DISC** : Death-Inducing Signaling Complex
- DMBA** : 7,12- dimethylbenz[a]anthracene
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMLA** : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DPA** : Acide docosapentaénoïque
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- EGCG** : Epigallocatechine gallate
- eIF2 $\alpha$**  : Eucaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$
- EPA** : Acide eicosapentaénoïque
- ERA** : Espèces Réactives de l'Azote
- ERK** : Extracellular signal-Regulated protein Kinase
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- EtOH** : Ethanol
- FADD** : Fas-Associated Death Domain
- FDA** : Fluorescéine diacétate
- Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux
- Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique
- FOXO** : Forkhead box O

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power

**GH** : Growth Hormone

**GPP** : Géranyl-pyrophosphate

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GRP 78** : Glucose-Regulated Protein 78

**GSH** : Glutathion réduit

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

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**HE** : Huile essentielle

**HMGB 1** : High Mobility Group Box 1

**HO<sup>•</sup>** : Radical hydroxyle

**Hsc 70** : Heat Shock Cognate 70

**HSP 70** : Heat Shock Protein 70

**IC<sub>50</sub>** : 50% Inhibiting Concentration

**ICAM** : Intercellular Cell Adhesion Molecule

**IGF-1** : Insulin-like Growth Factor-1

**IGFBP-3** : Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3

**IL-1 $\beta$**  : Interleukine 1 $\beta$

**iNOS** : Inductible Nitric Oxide Synthase

**IP** : Iodure de Propidium

**IRE 1 $\alpha$**  : Inositol-Requiring transmembrane kinase Endoribonuclease 1 $\alpha$

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>** : Hexacyanoferrate de potassium

**KOH** : Hydroxyde de potassium

**LAMP-2a** : Lysosome-Associated Membrane Protein-2a



**LC3** : Light Chain 3

**LDL** : Low Density Lipoprotein

**LRI** : LC3-Interacting Region

**LRRK 2** : Leucine-Rich Repeat Kinase 2

**MA** : Maladie d'Alzheimer

**MDA** : Malondialdéhyde

**MP** : Maladie de Parkinson

**mPTP** : Mitochondrial Permeability Transition Pore

**mTOR** : Mammalian Target Of Rapamycin

**NADPH-oxydase** : Adénine dinucléotide phosphate-oxydase

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**NIX** : NIP3-like Protein X

**NLRP3** : NOD-LRR and pyrin domain containing Protein 3

**NO** : Oxyde nitrique

**Nrf 2** : Nuclear factor erythroid 2

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde

**O<sub>3</sub>** : Ozone

**PAI-1** : Plasminogen Activator Inhibitor-1

**PAOT** : Pouvoir Antioxydant Total

**PARP** : Poly (ADP-Ribose) Polymérase

**PBS** : Phosphate-Buffered Saline

**PDE** : Phosphodiesterase

**PERK** : PKR-like ER Kinase

**PEX** : Peroxine

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PFBBr** : Pentafluorobenzyl bromide

**PGC-1 $\alpha$**  : PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) Gamma Coactivator-1 $\alpha$

**PI3K** : Phosphatidylinositol-3-kinase

**PI3P** : Phosphatidylinositol-3-phosphate

**PINK 1** : PTEN-Induced Kinase 1

**PKC** : Protéine Kinase C

**PMP 70** : 70 kDa Peroxysomal Membrane Protein

**PPAR  $\alpha/\beta$**  : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha/\beta$

**PSEN** : Préséline

**PTS1** : Peroxysomal Targeting Signal 1

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RIPK** : Receptor Interacting Protein Kinase

**RM** : Régime méditerranéen

**RSV** : Trans-resvératrol

**SAHF** : Senescence-Associated Heterochromatin Foci

**SASP** : Senescence Associated Secretory Phenotype

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**SIRT 1** : Sirtuin 1

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SR101** : Sulforhodamine 101

**SVF** : Sérum du Veau Fœtal

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor- $\beta$

**TLR** : Toll Like Receptor

**TMCS** : Triméthylchlorosilane

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

**TPTZ** : 2,4,6-Tris (2-pyridil) -s-triazine

**TRADD** : Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-associated Death domain

**TRAF 2** : TNF Receptor Associated Factor 2

**UBA** : Ubiquitin associated

**ULK** : UNC-51 Like Kinase

**UPR** : Unfolded Protein Response

**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**Vps 34** : Vesicular Protein Sorting 34

**X-ALD** : Adrénoleucodystrophie liée au chromosome X

**$\Delta\Psi_m$**  : Potentiel transmembranaire mitochondrial

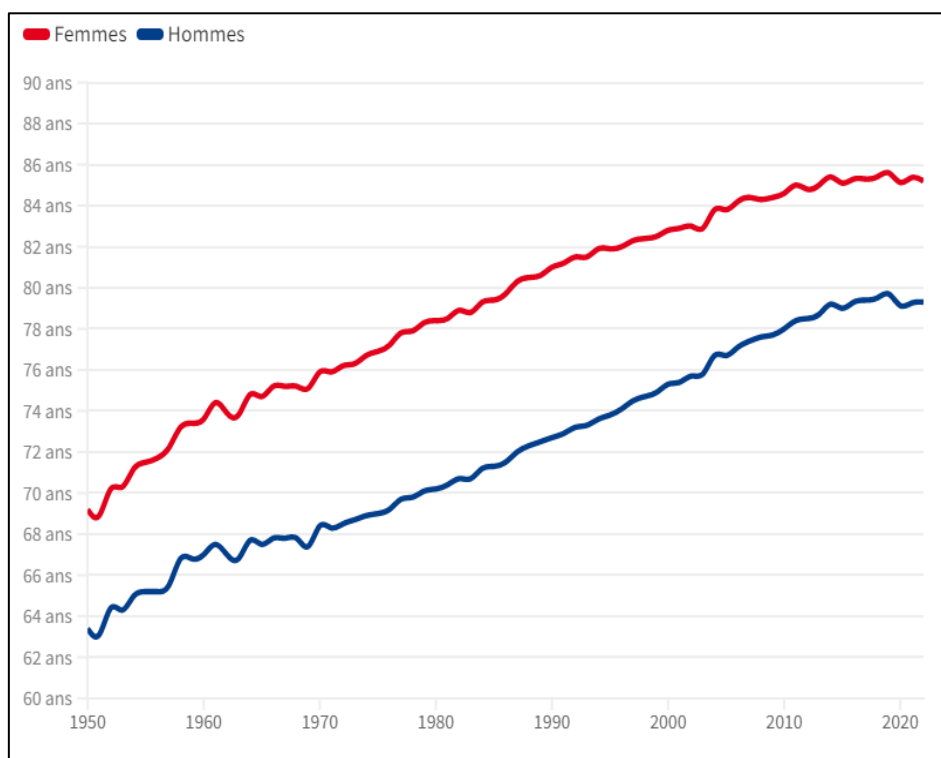
---

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

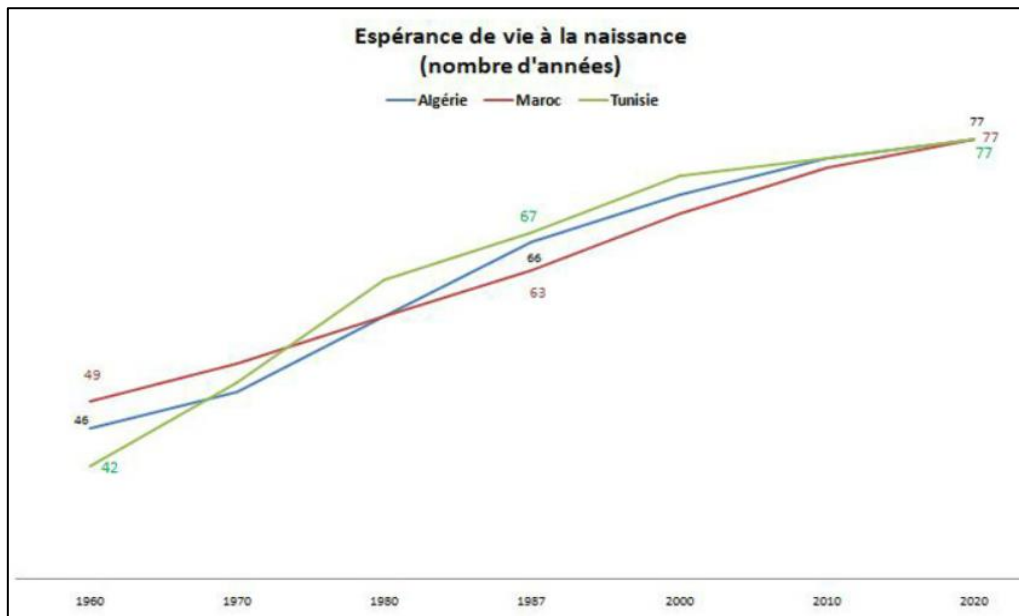
## I. Vieillesse et espérance de vie en bonne santé

Avec l'augmentation de la durée de vie, le vieillissement est un sujet de préoccupation majeure tant au niveau économique que social. C'est un phénomène démographique qui affecte l'ensemble des pays du monde mais à des degrés différents. Actuellement, plus de 600 millions de personnes ayant l'âge de 60 ans ou plus sont recensées sur l'ensemble des continents, et ce nombre pourrait doubler d'ici 2050, représentant environ 20% de la population mondiale selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**World Health Organization, 2015**). Par exemple, en France, l'espérance de vie en bonne santé s'est allongée. En effet, à l'âge de 65 ans, les hommes peuvent espérer vivre 11,3 ans et les femmes 12,6 ans sans être limité dans les activités de la vie quotidienne d'après la Direction de la Recherche, des Etudes, de l'Evaluation et des Statistiques (**DREES, 2021** : <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/>; consulté le 25 Février 2023). Cette augmentation significative de la durée de vie donne un indicateur d'espérance de vie, calculé en 2008, qui progresse de 2 ans et 7 mois pour les femmes et 2 ans et 8 mois chez les hommes (**Figure 1**).



**Figure 1:** Espérance de vie à la naissance entre 1950 et 2022 en France (**DREES, 2021**) (<https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/> ; consulté le 25 Février 2023)

Par ailleurs, les pays du nord de l'Afrique ont connu un allongement important de l'espérance de vie, en particulier la Tunisie qui est passée de 42 ans en 1960 pour atteindre 77 ans pendant ces dernières années selon les indicateurs de la Banque mondiale (Décembre 2019) (<https://donnees.banquemondiale.org/> ; consulté le 26 Février 2023) (**Figure 2**).



**Figure 2:** Espérance de vie à la naissance dans les pays du Nord de l'Afrique (<https://donnees.banquemondiale.org/> ; consulté le 26 Février 2023)

Cette amélioration reste significative mais comparativement plus faible que celle de la France qui atteint le niveau de 84 ans contre 70 ans en 1960 (**Figure 1**). Ces résultats méritent cependant d'être considéré avec prudence. En effet, l'augmentation de la durée de vie n'est pas synonyme de vieillir dans de bonnes conditions.

Il existe de nombreux facteurs qui contribuent à l'augmentation importante du vieillissement de la population mondiale. Parmi ceux-ci, on trouve une diminution considérable de plus de la moitié de la mortalité infantile au cours de ces dernières décennies passant de 12,6 millions d'enfants morts en 1990 à 5 millions de décès en 2020 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2019**) (<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/child-mortality-and-causes-of-death>; consulté le 26 Février 2023). Cette diminution a été particulièrement remarquable dans les pays à faible revenu où le taux de la mortalité a chuté de 60%. De plus, la vaccination représente un facteur clé dans l'amélioration de l'espérance de vie en sauvant entre 3,5 et 5 millions de vies chaque année contre environ 20 maladies potentiellement mortelles selon l'OMS ([https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1) ; consulté le 26 Février 2023). L'amélioration de l'alimentation

est aussi un élément crucial pour un vieillissement plus long en bonne santé. En effet, une carence en nutriments est responsable de 20% de toutes les maladies et des mortalités dans le monde entier. Une carence en vitamines et en minéraux peut augmenter le risque des maladies chroniques telles que le diabète et les maladies cardiaques (**Lim et al., 2016**). Ces différents paramètres conduisent à une augmentation de l'espérance de vie des personnes vieillissantes qui s'élève de 5,5 ans passant de 66,5 à 72 ans entre 2000 et 2016 (**Beltrán-Sánchez et al., 2015**). Les avancées médicales et technologiques ont permis de prolonger la vie des individus conduisant à un vieillissement de la population. De plus, la baisse de la fécondité est un autre facteur considérable conduisant à une augmentation de la proportion des personnes de plus de 60 ans (**Chao et al., 2019**). L'indice de fécondité a été diminué, au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, de près de 50% allant de 5 à 2,6 enfants par femme et cet indice devrait encore diminuer à 2 enfants par femme (**Puts et al., 2005**). Ce phénomène de vieillissement observé dans l'ensemble des continents est lié aussi aux facteurs socio-économiques : Les changements concernant l'urbanisation et la structure familiale ont également une influence qui entraîne une diminution de la taille de famille ce qui provoque une baisse du nombre d'enfants et une élévation du vieillissement de la population (**Colcombe & Kramer, 2003; Peters et al., 2009**). Les facteurs socio-économiques, comme le niveau de développement, les conditions économiques et les politiques sociales influencent aussi le vieillissement de la population. Par exemple, les pays à revenu élevé ont tendance à avoir une population plus âgée que les pays à revenu faibles en raison d'un meilleur niveau de vie, de structures médicales plus efficaces et de politiques sociales prenant plus en compte les personnes âgées (**Beard et al., 2016**).

## II. Maladies liées à l'âge

Le vieillissement est un phénomène naturel intrinsèque qui affecte tous les organes du corps humain. Il est important de souligner que chaque individu n'est pas égal devant le vieillissement ce qui a conduit à distinguer le vieillissement chronologique (âge réel) du vieillissement physiologique (âge biologique : âge estimé sur des paramètres biologiques et physiologiques). Toutefois, les méthodes de calcul de l'âge biologique sont extrêmement variables, et l'âge biologique estimé peut énormément différer en fonction des algorithmes de calcul utilisé. Le vieillissement est caractérisé par une altération progressive des tissus et des organes, en raison de plusieurs modifications cellulaires conduisant au fil du temps, c'est-à-dire progressivement, à des altérations physiques non pathologiques. Le vieillissement n'est donc pas une pathologie mais celui-ci, chez certaines personnes, peut favoriser l'émergence de maladies liées à l'âge

telles que certains cancers (prostate, sein), les maladies cardiovasculaires, certaines maladies oculaires (DMLA, glaucome), des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson), la sarcopénie et l'ostéoporose. Dans tous les cas, le vieillissement conduit à des modifications cutanées (vieillissement de la peau), à la presbytie et à la cataracte. Le vieillissement peut dans certains cas être accéléré (Progéria) ou ralenti (syndrome de Laron) en relation avec des anomalies génétiques.

Mieux connaître le vieillissement et les maladies liées à l'âge qui peuvent y être associée est donc un enjeu économique et social majeur quel que soit les pays.

### **1. Cancers associés au vieillissement**

Le cancer est une maladie complexe et très fréquente, mais certaines formes de cancers sont liées à l'âge. Plusieurs types de cancers comme le cancer de la prostate, certains types de cancers du sein et les sarcomes cutanés ont des conséquences accrues sur les populations âgées. En effet, le cancer de la prostate est la forme du cancer la plus courante qui touche les hommes à partir de l'âge de 50 ans. Des études ont montré que plus de 60% des cas du cancer de la prostate touchent les hommes âgés de 65 ans et plus (**Siegel et al., 2019**). Par ailleurs, environ deux tiers des cas du cancer du sein sont diagnostiqués chez les femmes de 55 ans plus susceptibles d'avoir des tumeurs plus agressives (**Howlader et al., 2014**). De même, les sarcomes cutanés sont également plus fréquents chez les individus âgés à cause de l'exposition cumulative aux rayons UV qui endommage l'ADN et peut conduire à la formation des tumeurs (**Karagas et al., 1999; Mentzel, 2011**).

Le vieillissement présente un élément indépendant pour le développement des cancers en raison de l'accumulation des facteurs de risque environnementaux, des mutations génétiques qui se produisent au fil du temps et de l'affaiblissement du système immunitaire chez les personnes âgées, ce qui provoque une difficulté pour l'organisme pour lutter contre les cellules cancéreuses (**Cinar & Tas, 2015**).

### **2. Maladies cardiovasculaires**

Le vieillissement déclenche des troubles structuraux et fonctionnels au niveau du système cardiovasculaire qui se manifestent par une diminution de la capacité du cœur à se contracter et à se relaxer (**SEALS et al., 2011**) et par une baisse d'élasticité artérielle entraînant une augmentation de la pression artérielle systolique (**Laurent & Boutouyrie, 2015**). L'aspect morphologique du cœur vieillissant présente aussi des modifications avec des augmentations



de l'épaisseur, de la densité de la paroi et du volume télédiastolique du ventricule gauche. Ces symptômes pourraient rendre les personnes âgées vulnérables au développement des maladies cardiovasculaires liées à l'âge telles que l'hypertension, la sténose aortique et l'insuffisance cardiaque congestive (**Khan, Singer, et al., 2017**). De plus, la fibrillation cardiaque est considérée comme l'une des maladies cardiovasculaires la plus courante. Sa prévalence augmente significativement en particulier aux Etats-Unis. Une étude prévoit que 5,6 millions d'américains âgés souffriront de fibrillations cardiaques associées également à un risque accru d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et de décès cardiovasculaires (**Tsang et al., 2003; Tayal et al., 2008**).

Les maladies cardiovasculaires sont des maladies qui touchent le cœur et les vaisseaux sanguins (**Laurent & Boutouyrie, 2015**). Elles comprennent principalement l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, l'arythmie et l'insuffisance cardiaque et la maladie coronarienne. Ces pathologies sont les plus fréquentes chez les individus âgés et ayant un mode de vie à risque (tabagisme, obésité, hypertension artérielle, hypercholestérolémie, alimentation inadéquate et activité physique insuffisante). Une étude a révélé que les maladies cardiovasculaires affectent plus d'un milliard de personnes et provoquent environ de 9.4 millions de décès chaque année (**Ettehad et al., 2016**). D'ici 2030, un cinquième de la population ayant un âge supérieur à 65 ans sera concerné par les maladies cardiovasculaires entraînant des décès (**Costantino et al., 2016**). L'athérosclérose représente la pathologie vasculaire la plus courante chez les personnes âgées caractérisée par l'apparition des plaques d'athérome due à l'accumulation locale des lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoproteins* : LDL) affectant la paroi artérielle (**Russell, 1999**), ce qui contribue à développer certaines maladies graves telles que les maladies cardiaques (infarctus) (**Zarrouk et al., 2014**).

### **3. Maladies oculaires**

Le vieillissement oculaire concerne toutes les personnes au-delà de 50 ans : presbytie, cataracte, parfois DMLA et/ou glaucome. Ces maladies invalidantes peuvent être corrigées plus ou moins facilement.

#### **3.1. Presbytie**

La presbytie est une maladie courante qui se développe chez les personnes de plus de 40 ans. En 2005, cette pathologie a touché plus d'un milliard de la population mondiale (**Fricke et al., 2018**). C'est un processus naturel inévitable qui se produit lorsque le cristallin de l'œil perd son élasticité ce qui provoque un trouble de vision avec une difficulté de la mise au point. Elle est

caractérisée aussi par une réduction de la taille de la pupille et de la luminance rétinienne avec des altérations au niveau de l'emplacement physique et de la quantité de diverses cellules comme les photorécepteurs et les cellulaires bipolaires et ganglionnaires de la rétine (**Erdinest et al., 2021**). Il existe plusieurs facteurs contribuant à la presbytie notamment les changements structurels de l'œil avec l'avancée de l'âge et l'exposition à long terme à la lumière bleue émise par les écrans et les dispositifs électroniques ce qui peut provoquer des chutes, et ce qui affecte potentiellement la qualité de vie de la personne en perturbant l'exécution des tâches quotidiennes courantes.

### 3.2. Cataracte

La cataracte est une maladie oculaire très fréquente qui est l'une des principales causes de déficience visuelle dans le monde. La cataracte peut apparaître dès l'âge de 50 ans avec l'apparition de symptômes marqués entre l'âge de 60 et 70 ans. Cette pathologie se manifeste par une opacification du cristallin (**Jackson & Owsley, 2003**). Selon l'OMS, la cataracte est à l'origine de plus de 40% de cas de cécité chez les populations âgées (**Xu et al., 2020**). Une étude a affirmé que l'exposition accrue aux dommages oxydatifs est l'un des facteurs majeurs induisant le développement de la cataracte chez les personnes hypertendues (**Kisic et al., 2018**).

### 3.3. Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une pathologie dégénérative rétinienne qui apparaît chez les sujets de plus de 50 ans. La DMLA affecte la macula de la rétine, responsable de la vision centrale et de la perception des couleurs en raison de l'accumulation de dépôts lipidiques rétiens appelés drüsen, ce qui peut entraîner une vision centrale floue (**Thomas et al., 2021**). Au cours cette maladie, le stress oxydant s'élève au sein de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine. Ceci conduit à la formation de 7-cétocholestérol (7KC) favorisant le développement et l'aggravation de la maladie par ses effets pro-oxydants et pro-inflammatoires (**Moreira et al., 2009; Rodriguez et al., 2014**).

### 3.4. Glaucome

Le glaucome est une maladie oculaire chronique qui représente aussi une cause de cécité irréversible dans le monde. C'est une neuropathie optique caractérisée par une pression intraoculaire élevée avec une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine, ce qui induit une perte de vision périphérique permanente (**Weinreb et al., 2014**). Il existe deux types de glaucome notamment le glaucome à angle ouvert et le glaucome à angle fermé. Le glaucome à angle ouvert est le type le plus fréquent défini par une atrophie progressive des fibres nerveuses optiques et par une pression intraoculaire élevée, tandis que le

glaucome à angle fermé, qui est moins courant, comprend un écoulement du liquide intraoculaire appelé l'humeur aqueuse engendrant des symptômes aigus tels que les nausées, le vomissement et des douleurs optiques. La prévalence de cette pathologie, qui est très fréquente chez les populations asiatiques et africaine, a connu une accélération considérable : En 2010, une estimation du nombre de personnes atteintes était de l'ordre de 60,5 millions pour atteindre 79,6 millions en 2020 (Quigley & Broman, 2006).

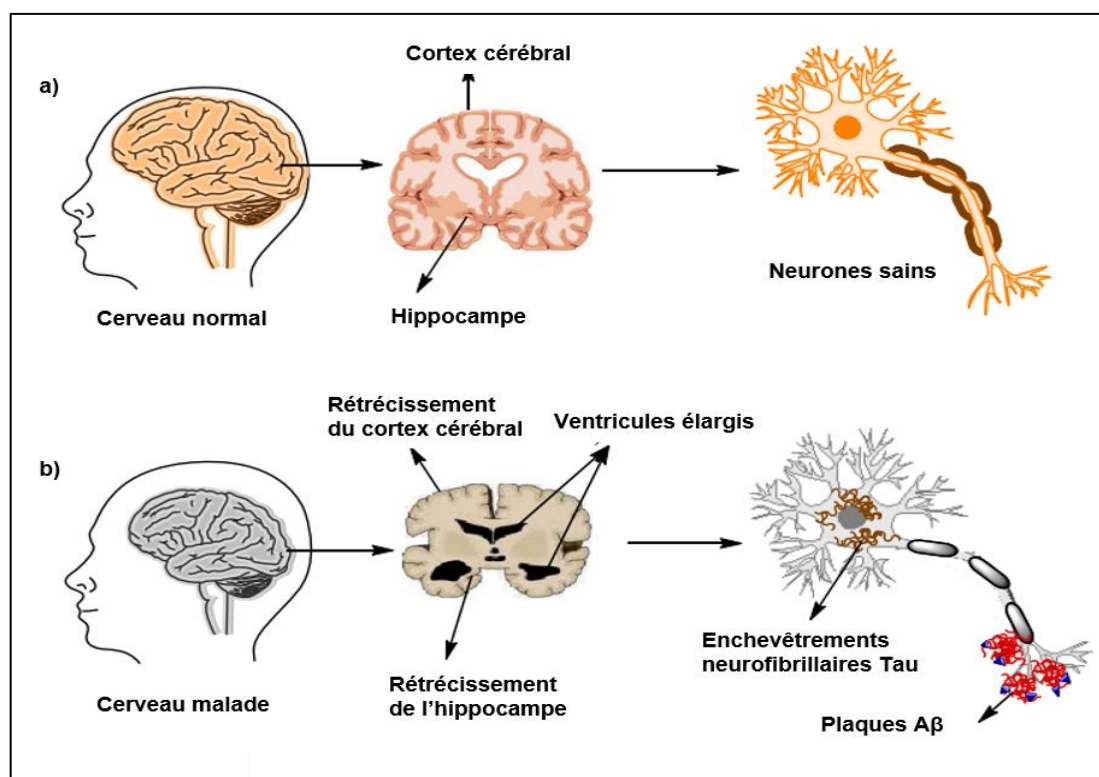
### 3.5. Maladies neurodégénératives liées à l'âge : Alzheimer et Parkinson

Au niveau cérébral, le vieillissement peut entraîner une diminution des capacités cognitives (Aartsen et al., 2002) caractérisée par une neurogenèse altérée associée à des modifications de la structure et de la plasticité synaptique (Sikora et al., 2021). Ce déclin cognitif peut favoriser une baisse de l'autonomie et de la qualité de vie empêchant un « vieillissement sain et réussi » (Vanleerberghe et al., 2017). Au niveau cérébral, le vieillissement peut en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques conduire à des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (Loerch et al., 2008). Le vieillissement constitue un facteur de risque majeur pour le développement des démences vasculaires dues à des problèmes de circulation sanguine cérébrale (Gorelick et al., 2011; O'Brien & Thomas, 2015).

- La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique liée à l'âge qui touche le système nerveux central dans les régions cérébrales responsables du contrôle et de la coordination des mouvements. C'est un trouble très fréquent qui affecte 2 à 3 % des personnes âgés de plus de 65 ans. Cette maladie est caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques dans la substance noire du cerveau induisant une diminution de production de dopamine, qui le neurotransmetteur responsable à la régulation des mouvements du corps, avec des inclusions intracellulaires contenant des agrégats d' $\alpha$ -synucléine (Poewe et al., 2017), ce qui provoque des tremblements, une lenteur des mouvements, une rigidité musculaire avec des troubles d'équilibre et de la coordination (Jankovic & Kapadia, 2001). Bien que des facteurs environnementaux présentent un impact sur le développement de la maladie, des facteurs génétiques semblent impliqués notamment des mutations au niveau du gène SNCA codant pour la protéine  $\alpha$ -synucléine (Polymeropoulos et al., 1997) et au niveau du gène LRRK2 codant pour la protéine Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (Zimprich et al., 2004). Au niveau cellulaire, le stress oxydatif qui résulte d'un dérèglement de l'équilibre redox par l'augmentation de la production des ERO, se

manifeste comme un élément clé du processus de dégénérescence entraînant une oxydation des protéines (carbonylation protéique) et de l'ADN, un dysfonctionnement mitochondrial, et une peroxydation lipidique (Trist et al., 2019), ce qui provoque l'altération de la fonction et de la structure des tissus nerveux d'où la perte progressive des neurones.

- La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative liée à l'âge, qui présente la principale cause de démence. En 2001, plus de 24 millions d'individus sont affectés, et ce chiffre devrait connaître une augmentation exponentielle pour atteindre 81 millions en 2040 (Blennow et al., 2006). La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des troubles cognitifs et comportementaux, perte de mémoire, stress oxydant et accumulation de protéines pro-agrégantes (amyloïde- $\beta$ ) dans des régions bien définies du cerveau, ce qui favorise la formation des plaques A $\beta$  et des enchevêtrements neurofibrillaires par hyperphosphorylation de la protéine Tau (Figure 3). Ces symptômes sont accompagnés par des facteurs de risque, ayant un impact sur l'extension de cette maladie, tels que l'avancée en âge, les traumatismes crâniens et d'autres facteurs génétiques et environnementaux (Breijyeh & Karaman, 2020).



**Figure 3: Structure physiologique du cerveau et de neurones : a) cerveau sain et b) cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer (Breijyeh & Karaman, 2020)**

L'intensification de la protéine Tau hyperphosphorylée, l'accumulation de l'A $\beta$  et la dégénérescence neurofibrillaire déclenchent la mort cellulaire en perturbant les membranes mitochondriales, ce qui va altérer les activités enzymatiques de la chaîne respiratoire, libérer les radicaux libres et activer les caspases en réponse au stress oxydatif induit (Nury et al., 2020). De plus, des facteurs génétiques sont associés à un risque accru au développement de la maladie d'Alzheimer. Ces facteurs comprennent des mutations de préséniline 1 et 2 (PSEN 1 et PSEN 2) et des mutations ou duplications de l'APP (Amyloid Precursor Protein) (Ryan & Rossor, 2010; Hardy, 2017). Des études ont montré que les mutations du PSEN 1 et PSEN 2 engendrent un dysfonctionnement lysosomal qui contribue à un nombre important d'autophagosomes générés par une autophagie mitochondriale (Barrientos et al., 2015). Les mutations de PSEN 1 favorisent la production d'A $\beta$ 42 qui est la forme la plus toxique de l'A $\beta$ , en altérant la signalisation Notch dans les cellules neuronales (Thinakaran & Koo, 2008). Une autre étude a révélé que les mutations induites au niveau de l'APP stimulent la production d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 provoquant une accumulation accrue de plaques amyloïdes dans le cerveau des souris transgéniques (Mucke et al., 2000).

Actuellement, afin de traiter les symptômes la maladie d'Alzheimer, les médicaments approuvés sont des inhibiteurs de l'enzyme cholinestérase tels que la galantamine et le donépézil et des antagonistes non compétitifs des récepteurs de l'acide N-méthyl-D-aspartique tels que la mémantine ; néanmoins, ces médicaments présentent une faible efficacité (Breijyeh & Karaman, 2020).

### 3.6. Sarcopénie : dégénérescence du muscle squelettique

La masse musculaire squelettique et la densité osseuse diminuent avec le vieillissement, en particulier chez la femme âgée (Manini & Clark, 2012). Ce déclin fonctionnel contribue à une perte d'équilibre et de mobilité, à une perte d'autonomie ainsi qu'à une augmentation du risque de chute chez les personnes âgées (Evans & Lexell, 1995; VELLAS et al., 2013; Frontera, 2017). Chez certaines personnes on peut observer une diminution des réflexes et de la force musculaire pouvant nécessiter une prise en charge nutritionnelle et/ou médicale (Cruz-Jentoft et al., 2019). Cette perte de masse musculaire peut aboutir à la sarcopénie. C'est une pathologie définie comme la perte progressive de la force, de la masse et de la fonction musculaires accompagnée par une perte du potentiel de régénération avec une augmentation de la graisse corporelle. La sarcopénie est élevée chez les individus âgés à mobilité réduite et peut atteindre jusqu'à 50% chez les personnes ayant l'âge de plus de 80 ans (Cruz-Jentoft et al., 2010), ce

qui contribue à une réduction de la durée et de la qualité de vie ainsi qu'une augmentation des risques de chute, de dépendance et de la mortalité (**Polero et al., 2021**). La physiopathologie de la sarcopénie est causée par divers facteurs principalement la mauvaise nutrition, la diminution de l'activité physique, l'altération du métabolisme musculaire et l'inflammation chronique. La sarcopénie est associée à une inflammation chronique, un stress oxydant et un dysfonctionnement mitochondrial contribuant à des défenses antioxydantes atténuées et à une augmentation de la production des radicaux libres (**Gaffney et al., 2018**). Ces changements participent à l'altération de la fonction mitochondriale, à l'affaiblissement de la capacité aérobie des muscles squelettiques et à la diminution de la taille et de la qualité des fibres musculaires.

### 3.7. Ostéoporose

Cette pathologie liée à l'âge est caractérisée par une altération de l'architecture osseuse ainsi qu'à une diminution de la densité minérale osseuse, ce qui entraîne une fragilité osseuse aggravée avec un risque accru de fractures (**Cosman et al., 2014**) dont les plus fréquentes sont des fractures de la colonne vertébrale, du poignet et de la hanche. Environ de 200 millions d'individus de la population mondiale souffrent de l'ostéoporose, ce qui engendre des conséquences graves pour la qualité de vie de ces personnes (**Sozen et al., 2017**). Il est important de souligner que l'amélioration de la qualité de vie des patients peut prévenir les facteurs de risque et que l'ostéoporose est liée au manque d'activité physique, à la consommation excessive d'alcool, au tabagisme et à la ménopause.

### 3.8. Vieillesse cutané

Le vieillissement cutané est la forme la plus évidente du vieillissement. C'est un phénomène naturel qui apparaît avec l'âge. C'est un processus qui résulte qui fait intervenir de nombreux facteurs pouvant entraîner des dommages au niveau des fonctions cutanées (**Csekes & Račková, 2021**). Le vieillissement cutané conduit à l'apparition de rides et de ridules avec diminution d'élasticité, de densité et de volume accompagnée par des modifications pigmentaires touchant les différentes couches de la peau (épiderme, derme) (**Figure 4**). Le renouvellement cellulaire est abaissé avec un ralentissement de la prolifération des kératinocytes. Le vieillissement de la peau n'est pas qu'un signe visible avec l'âge, mais il est associé à une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques (**Farage et al., 2008**). Les facteurs extrinsèques sont le tabagisme, les facteurs de stress (anxiété, mode de vie, etc), pollution atmosphérique et exposition au soleil. En effet, les rayons ultra-violet (UV) du soleil provoquent des dommages au niveau structurel en réduisant la production de collagène et d'élastine, ce qui induit à la formation de rides et de ridules associés à des taches pigmentaires

et à un aspect rugueux ; les UV favorisent aussi la mutagénicité par production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et provoquent également des dysfonctions mitochondriales (Fisher et al., 2002). Les UV peuvent aussi modifier des activités enzymatiques provoquant la déstructuration de l'épiderme et du derme (Csekés & Račková, 2021; Papaccio et al., 2022).

Les facteurs intrinsèques liés au vieillissement cutané comprennent des modifications de l'expression des kératines au niveau de l'épiderme et une réduction de la production de collagène et d'élastine impliquées dans la capacité de rétention de l'eau au niveau du derme (S. Zhang & Duan, 2018).



**Figure 4:** Aspect morphologique de la peau d'une personne âgée (Farage et al., 2008)

### 3.9. Maladie pulmonaire

Le vieillissement peut également affecter la fonction pulmonaire où la capacité respiratoire peut baisser de 20% ou plus chez les personnes de plus de 70 ans (Khan et al., 2017). En effet, les personnes âgées subissent des modifications physiologiques au niveau de la structure et de la fonction des poumons telles que la réduction de la flexibilité des alvéoles, ce qui réduit la capacité des poumons de se dilater et se contracter efficacement d'où une ventilation insuffisante pour répondre aux besoins de l'organisme en oxygène. Ceci peut altérer, la fonction des muscles respiratoires ce qui amplifie le phénomène (Rodriguez-Roisin et al., 1999). Ces changements rendent les personnes âgées plus vulnérables aux maladies respiratoires : emphysème, pneumonie et bronchite chronique.

### **3.10. Maladies génétiques associées à un vieillissement accéléré**

#### **3.10.1. Progéria**

La définition de cette maladie a été introduite par Gilford. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1886 comme une absence congénitale de cheveux et de leurs appendices; il est aussi connu sous le nom de syndrome de Progéria de Hutchinson-Gilford (**Agarwal et al., 2010**). Cette maladie génétique (autosomique dominante), rare (affectant une personne sur 4 millions au niveau de la population mondiale) entraîne un vieillissement prématuré : ralentissement aigu de croissance ; développement de caractéristiques semblables à une personne âgée. Les symptômes de Progéria sont visibles dès l'âge de 1 ou 2 ans. La Progéria est le résultat d'une mutation génétique qui touche une protéine appelée Lamine A (**Eriksson et al., 2003**). Cette protéine sert à maintenir la structure du noyau cellulaire. Cette mutation induit une accumulation de la protéine Progérine qui interfère avec le fonctionnement normal de la cellule. La progéria est caractérisée par une croissance lente, des os fragiles, une peau fine et ridée et une insuffisance cardiaque ce qui rend les enfants malades susceptibles de développer des maladies cardiovasculaires telles que les accidents vasculaires cérébraux et les crises cardiaques (**Gordon et al., 2011; Gordon et al., 2014**).

#### **3.10.2. Syndrome de Laron**

Le syndrome de Laron est aussi une pathologie génétique liée à l'âge qui contrairement à la Progéria augmente l'espérance vie. Ce syndrome est rare avec une prévalence estimée à 1 sur 1 million dans le monde entier. Cette maladie est caractérisée par un nanisme sévère, une réduction de la masse musculaire, une faible densité osseuse, une dysmorphie faciale et de l'obésité (**Laron, 2004**). Des travaux, menés pour comprendre l'impact et la prévalence du syndrome de Laron sur la population des indiens de l'Amérique du Sud, ont indiqué que cette population est affectée par la maladie avec un taux de prévalence de l'ordre de 1 pour 4 000 habitants dans certaines régions de l'Equateur et du Pérou (**Guevara-Aguirre et al., 2015**). De même, il est suggéré que cette pathologie touche certaines populations juives éthiopiennes avec une estimation de 1 pour 400 habitants. Le syndrome de Laron est causé par une mutation génétique au niveau du récepteur de l'hormone de croissance (GH : Growth Hormone) empêchant la liaison entre l'hormone et son récepteur ce qui va limiter, par conséquent, la capacité à stimuler la croissance des tissus et des os. Les personnes affectées par le syndrome de Laron ont des taux de GH élevés et produisent peu d'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1).



## 4. Implication de la génétique et de l'épigénétique dans le vieillissement

### 4.1. Aspect génétique du vieillissement

Le vieillissement implique plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires. Les découvertes récentes dans le domaine de la génétique ont révélé que les variations génétiques jouent un rôle secondaires dans le vieillissement (**Gialluisi et al., 2021**). La génétique interviendrait à 25% dans le processus de vieillissement et l'épigénétique à 75% (**Herskind et al., 1996**).

Les gènes impliqués dans le vieillissement sont les suivants :

- ✓ SIRT1 (Sirtuin 1): ce gène code pour une protéine appelée Sirtuine 1 qui joue un rôle clé dans la stabilité et le maintien du génome, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'autophagie, la senescence ainsi que dans la régulation épigénétique de l'homéostasie des tissus et dans de nombreuses maladies (**Alves-Fernandes & Jasiulionis, 2019**).
- ✓ p53 : ce gène peut moduler la réparation de l'ADN, l'apoptose et la senescence cellulaire et fonctionne comme un facteur de transcription dans le contrôle du cycle cellulaire et dans les réponses au stress des cellules (**Rufini et al., 2013**).
- ✓ APOE (Apolipoprotein E) : ce gène code pour la protéine apolipoprotéine E qui sert à transporter le cholestérol et d'autres lipides au niveau du système nerveux central. Elle est impliquée le métabolisme glucidique et la fonction mitochondriale ainsi que dans l'intégrité vasculaire et la plasticité synaptique (**Wisniewski & Drummond, 2020**). Les modifications de ce gène ont été associées à un risque accru des maladies cardiovasculaires comme l'accident vasculaire cérébral et la maladie coronarienne.
- ✓ Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2) : ce gène code pour un facteur de transcription de la région basique de la leucine jouant un rôle régulateur dans l'expression génétique coordonnée des enzymes antioxydantes et détoxifiantes afin de lutter contre les dommages oxydatifs induits par des conditions environnementales défavorables (**Zgorzynska et al., 2021**). La réduction de l'expression de Nrf2 peut entraîner des maladies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires ; tandis que son activation permet de prolonger la durée de vie d'où Nrf2 est considéré comme une cible prometteuse pour le développement des thérapies anti-âge.
- ✓ FOXO (Forkhead box O) : ce gène code pour la famille des facteurs de transcription (FOXO) régulant de nombreux processus biologiques notamment la différenciation, la prolifération cellulaire et la senescence. Une mutation de l'expression et de la fonction

FOXO peut causer des maladies graves en particulier le cancer (**Jiramongkol & Lam, 2020**).

- ✓ Daf-16 : C'est un gène orthologue de la famille FOXO des facteurs de transcription chez le nématode *Caenorhabditis elegans* qui présente un organisme modèle pour étudier l'impact génétique lié au vieillissement. Daf-16, codant pour une protéine FOXO et localisé sur le chromosome 1, est défini comme un régulateur clé de l'espérance de vie de ce ver. En effet, il a été identifié que ce gène agit comme un facteur de transcription en régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques tels le métabolisme, les stress oxydatif, l'apoptose, la lipogenèse et régénération tissulaire (**Lee et al., 2003; van der Horst & Burgering, 2007**). Les mutations de Daf-16 entraîne une réduction de l'espérance de vie chez *Caenorhabditis elegans*, tandis que son activation peut une extension profonde de la durée de vie (**C. Kenyon, 2005**). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance de Daf-16 dans le vieillissement et la longévité. Une étude a indiqué que la durée de vie de ce ver peut également doubler en grâce à l'activation de ce gène alors que son atténuation peut réduire l'espérance de vie (**Kenyon et al., 1993; Lin et al., 1997**).
- ✓ Daf-2 : ce gène code pour un récepteur de la tyrosine kinase de l'insuline qui régule la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) jouant un rôle important dans les voies métaboliques régulant le rythme de vieillissement (**Mahesh et al., 2021**). Des études menées sur *Caenorhabditis elegans* (**Kenyon et al., 1993; Kenyon, 2005**) et sur les drosophiles (**Tatar et al., 2001**) montrent que les mutations qui réduisent sur la fonction de ce gène (sous-expression) contribuent à un élargissement de l'espérance de vie caractérisé notamment par une résistance au stress oxydant, alors que les mutations qui augmentent sa fonction (surexpression) raccourcissent la durée de vie. Il a été suggéré que la réduction de l'activité de la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1 peut aussi prolonger la durée de vie des mammifères et de *Caenorhabditis elegans* en améliorant la survie en réponse au stress environnementaux (**Kenyon, 2010; Denzel et al., 2019**).
- ✓ mTOR (mammalian Target Of Rapamycine) : ce gène module l'autophagie, la croissance et la prolifération cellulaire. Une signalisation dérégulée de mTOR peut favoriser de nombreuses maladies y compris les hémopathies malignes contribuant au développement de leucémie (**Fan et al., 2021**).

- ✓ CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) : C'est un gène porté par le chromosome 16 humain. CETP est une protéine impliquée dans le métabolisme des lipides jouant un rôle central en facilitant les échanges de cholestérol estérifié entre les différentes lipoprotéines. Il est suggéré que des variations génétiques de CETP chez les personnes âgées de 70 ans et plus peuvent être associées à un risque accru de maladies cardiovasculaires, notamment les maladies coronariennes (**Jiang et al., 1992; Niu & Qi, 2015; Schaefer et al., 2019**).
- ✓ Serpine 1 : ce gène, situé sur le bras long du chromosome 7 humain, est connu sous le nom de gène de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1) qui est un inhibiteur de la fibrinolyse. Le gène Serpine 1 baisse la production de la protéine PAI-1 contribuant au vieillissement dont son niveau est élevé chez les personnes âgées, en particulier les personnes obèses, les diabétiques ou les individus qui souffrent des maladies cardiovasculaires. Cependant, les Amish sont susceptibles de porter le gène Serpine 1 d'où le ralentissement du vieillissement (environ dix ans de plus) (**Khan, Shah, et al., 2017**). Pour cette étude, une molécule TM5007 a été injectée dans des souris. Cette molécule neutralise PAI-1 entraînant une augmentation de la fibrinolyse. Sur la base de la structure de cette molécule, un autre agent TM5272 inhibe PAI-1 ce qui reflète que les souris traitées ont vécu plus longtemps que leur espérance de vie en réduisant le risque de développement des maladies cardiovasculaire (**Izuhara et al., 2010; Ploplis, 2011**).

Le vieillissement est associé à l'accumulation de dommages de l'ADN (mutations, lésions et cassures de l'ADN). Ces dommages peuvent être causés par des facteurs environnementaux tels que les radiations, les produits chimiques et l'oxydation. Le gène APOE est aussi impliqué dans le métabolisme de lipides et qui est associé à la maladie d'Alzheimer et à la longévité. Le gène FOXO3 est également associé à la longévité chez les humains et il est impliqué dans la régulation de l'expression génique en réponse aux facteurs de stress environnementaux (**Brooks-Wilson, 2013**).

D'autres recherches ont révélé que les télomères, les extrémités du chromosomes qui protègent l'ADN, raccourcissent avec l'âge (**Brooks-Wilson, 2013**). Des variations génétiques peuvent affecter la vitesse à laquelle les télomères raccourcissent, ce qui peut influencer la durée de vie des cellules. Des études sur les animaux ont montré que des manipulations génétiques peuvent prolonger la durée de vie (**Bonkowski & Sinclair, 2016**). En effet, la suppression du gène de siruine chez drosophiles, mouches des fruits, raccourcit leur durée de vie, tandis que la

surproduction de sirtuine chez les souris prolonge leur durée de vie (**Rogina & Helfand, 2004; Satoh et al., 2013**).

Il est important de souligner que le vieillissement est un processus multifactoriel (**Vijg & Suh, 2005**), impliquant d'une part des variations génétiques qui peuvent influencer les mécanismes moléculaires tels que la réparation de l'ADN et la longueur des télomères (**Jiang et al., 2021**), et d'autre part des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, l'exercice physique, le stress et l'hygiène de vie.

#### 4.2. Aspect épigénétique du vieillissement

L'épigénétique regroupe l'ensemble des facteurs externes physiques (UV, radiations) et chimiques (toxines) pouvant influencer l'expression des gènes et la synthèse protéique. Ces facteurs épigénétiques peuvent influencer la méthylation de l'ADN qui se traduit par l'addition d'un groupe méthyle au niveau de sites spécifiques de l'ADN, généralement des cytosines (**Carmona & Michan, 2016**) comme le site dinucléotidique CpG (**Horvath, 2013**). La méthylation de l'ADN peut affecter la régulation de l'expression des gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'homéostasie et la prolifération cellulaire (**Rowbotham, 2015**) ainsi que dans la réparation de l'ADN, la régulation de l'immunité et la réponse au stress induit par des stimuli environnementaux. De plus, une diminution de la méthylation de l'ADN a été associée à une diminution de la fonction mitochondriale (**Baccarelli et al., 2009**). Des changements dans la méthylation de l'ADN dans les régions régulatrices des gènes ont été associés à des modifications de l'expression de gènes impliqués dans la progression de l'âge et dans les maladies liées à l'âge (**Liu et al., 2018**).

Les facteurs environnementaux peuvent aussi agir sur les protéines (enzymes, récepteurs, etc) et affecter leur traduction et leur conformation. Ceci peut avoir d'importantes répercussions sur le métabolisme, l'inflammation, le stress oxydant, l'induction de mort cellulaire et l'activation de la sénescence (**Rufini et al., 2013**).

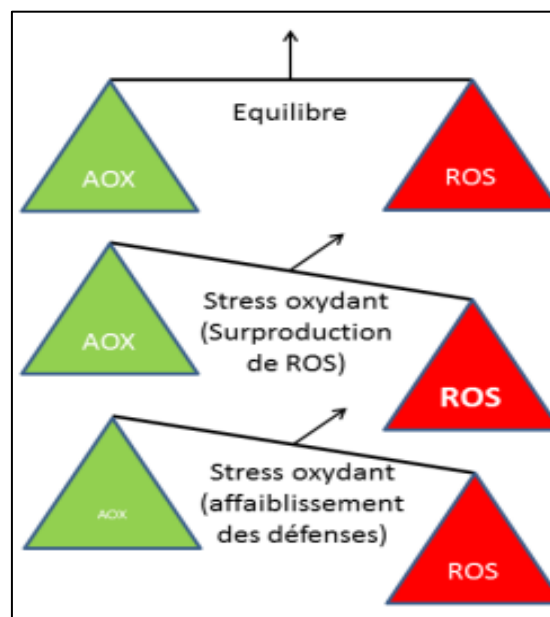
Parmi les facteurs environnementaux influençant le vieillissement ; le régime alimentaire est prépondérant et constitue un paramètre sur lequel il est possible d'agir pour vieillir en bonne santé en repoussant l'âge du « vieillissement dépendant » qui est un vieillissement associé à la maladie. Le régime Méditerranéen et le régime d'Okinawa constituent deux types d'alimentation ayant un impact positif sur le vieillissement en bonne santé. Plusieurs travaux ont aussi révélé que l'activité physique est importante pour vieillir en bonne santé (**Strasser & Fuchs, 2015**) et prévenir le déclin cognitif (**Bherer et al., 2013**), l'ostéoporose et la sarcopénie.

L'exposition aux toxines, le stress et l'activité physique peuvent également modifier les marqueurs épigénétiques du vieillissement, c'est le cas du bisphénol A, composé organique de la famille des aromatiques, utilisé principalement dans la fabrication de plastiques et de résines, qui modifie la méthylation de l'ADN et affecte la fonction mitochondriale avec pour conséquence une accélération du vieillissement (**Bansal et al., 2017**)

### III. Implication du stress oxydant dans le vieillissement

#### 1. Stress oxydant

Le stress oxydant se définit par une rupture d'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou les espèces réactives d'azote (ERA) et les systèmes antioxydants (**Figure 5**). Ce déséquilibre est dû à une surproduction d'espèces radicalaires ou alors un déficit des mécanismes de défense anti-oxydants, ou enfin la combinaison de ces deux phénomènes aboutit à une surexposition des molécules biologiques cibles vis-à-vis des réactions oxydatives dommageables (**Scandalios, 2002**).



**Figure 5:** Stress oxydant résultant d'un déséquilibre entre les ROS et les antioxydants (**Scandalios, 2002**)

Dans des conditions physiologiques normales, les cellules sont capables d'équilibrer la générations des espèces radicalaires et les antioxydants aboutissant à un équilibre rédox

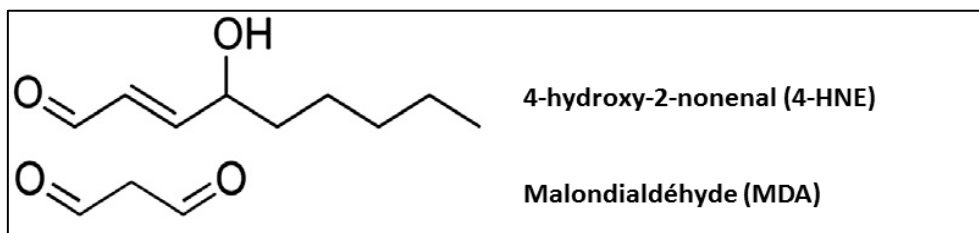
cellulaire. En effet, l'organisme dispose en permanence des radicaux libres (les ERO et les ERA) produits en faibles proportions afin d'assurer un bon fonctionnement cellulaire en intervenant dans le déroulement des voies de signalisation cellulaire qui contrôlent diverses fonctions physiologiques telles que la fonction cérébrale, la fonction immunitaire, la production d'énergie (Valko et al., 2007; Phaniendra et al., 2015; Gomes et al., 2017). Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un électron non apparié sur sa couche externe, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité avec les molécules stables pour d'apparier à son électron (Li et al., 2015). Il peut être radicalaire comme l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$ , le monoxyde d'azote  $\bullet NO$ , ou non radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'Ozone ( $O_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, lesquels sont adaptatifs via les niveaux des radicaux présents. Ces systèmes de défense antioxydants peuvent être enzymatiques (endogènes) à travers les enzymes antioxydantes Catalase, GPx, SOD, glutathion réductase, ou non-enzymatiques (exogènes) par l'alimentation particulièrement riche en polyphénols, en vitamines (vitamines A, C, E) et en caroténoïdes réduisant les altérations oxydatives (Wang et al., 2014). Les espèces radicalaires, tout en étant indispensables au bon fonctionnement cellulaire, sont les principaux perturbateurs de cet équilibre, étant donné leur grande réactivité. En effet, l'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles des cellules, ce qui conduit à une rupture de l'homéostasie RedOx entraînant des perturbations structurelles et fonctionnelles pouvant finir par une mort cellulaire. Cet état est observé physiologiquement au cours du vieillissement et il est à l'origine de l'apparition de pathologies chroniques (Valko et al., 2007), en particulier des pathologies cérébrales et cardiovasculaires en raison des besoins du cerveau et du coeur consommant beaucoup d'oxygène (Corbi et al., 2008).

## 2. Modifications moléculaires

Le stress oxydant, caractérisé entre autre par une surproduction d'espèces radicalaires est un processus physiologique qui peut provoquer des modifications et des endommagements oxydatifs aux biomolécules (lipides, protéines, ADN), contribuant éventuellement à de nombreuses maladies chroniques telles les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, certains cancers et le diabète de type 2 (Fang et al., 2002).

## 2.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un processus physiologique qui se produit par un stress oxydatif contribuant à des attaques radicalaires au niveau des lipides, notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI), dans les membranes cellulaires. Le SNC présente une sensibilité importante face à la peroxydation lipidique en raison de sa forte teneur en lipides, ce qui favorise le développement de la maladie d'Alzheimer (**Chen & Zhong, 2014**) et de la maladie de Parkinson (**Dias et al., 2013**). En effet, les constituants lipidiques neuronaux contiennent des taux importants d'acides gras insaturés qui comportent une ou plusieurs doubles liaisons présentant une cible d'attaque des radicaux libres (**Ayala et al., 2014**). L'atteinte des AGPI se déclenche par une réaction en chaîne pour détériorer les AGPI voisins (**Allanbutterfield et al., 2002**), ce qui entraîne la formation de nombreuses molécules de dégradation dont les plus abondantes sont le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) (**Sultana et al., 2013; Ayala et al., 2014**) (**Figure 6**).



**Figure 6:** Structure chimique des principaux produits de la peroxydation lipidique (aldéhydes)

Le 4-HNE et le MDA sont des marqueurs du stress oxydant et peuvent former des liaisons covalentes avec d'autres lipides et/ou des protéines (carbonylation protéique). Cette cascade de modifications provoque d'importants problèmes définis par des perturbations de la fonction cellulaire et des dommages tissulaires, ce qui peut également contribuer à des diverses maladies chroniques. Le processus de peroxydation lipidique engendre des changements au niveau de la membrane plasmique caractérisés par une diminution de la fluidité membranaire, des perturbations de l'intégrité de la membrane et des perturbations de la transmission des signaux au niveau des récepteurs membranaires suite à l'oxydation des phospholipides et éventuellement des récepteurs si ceux-ci contiennent des résidus lysines (**Ayala et al., 2014**).

Ainsi, tous les lipides peuvent être sujets au stress oxydant y compris le cholestérol qui peut subir des oxydations et former des composés oxydés du cholestérol appelés oxystérols

(Schroepfer, 2000). Cependant, l'oxydation du cholestérol est précédée par celle des acides gras polyinsaturés.

Le corps dispose des mécanismes pour neutraliser les radicaux libres et limiter la peroxydation lipidique à travers des molécules antioxydantes, telles que le Glutathion et l' $\alpha$ -tocophérol et des enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (Su et al., 2019), qui vont capter les ERO avant qu'ils réagissent avec les lipides, ce qui présentent des mécanismes clé de défense contre le stress oxydatif et la peroxydation lipidique. Des études ont montré que l'administration de la vitamine E pouvait réduire le stress oxydant et la peroxydation lipidique. La vitamine E contient quatre tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérol) et quatre tocotriénols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocotriénol) où l' $\alpha$ -tocophérol présente la forme la plus répandue dans le régime occidental avec une activité antioxydante importante (Cardenas & Ghosh, 2013), ce qui lui permet de réduire les effets délétères causés par les ERO ou par certains oxystérols tels le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC (Ragot et al., 2013). Il est important de noter que le maintien de l'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants est crucial pour prévenir et réduire le stress oxydant et la peroxydation lipidique.

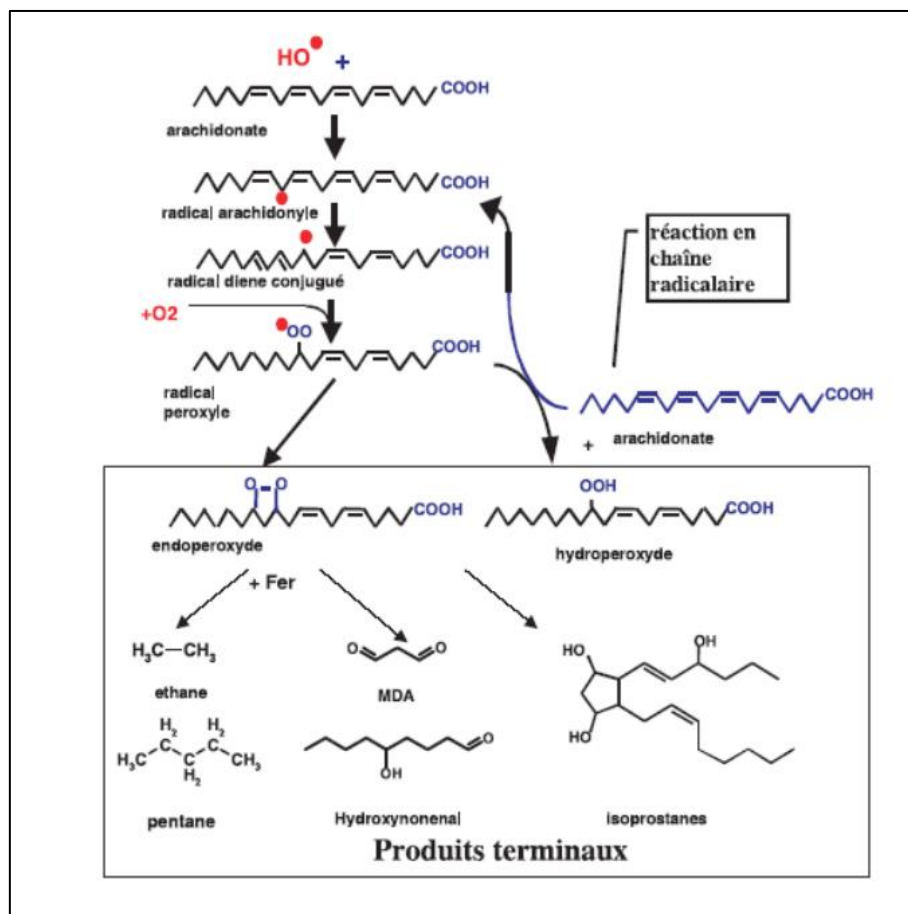


Figure 7: Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et produits terminaux



## 2.2. Carbonylation protéique

La carbonylation protéique est une modification post-traductionnelle oxydative des protéines qui implique l'addition d'un groupe carbonyle sur la chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé (Arginine, Lysine, Proline, Cystéine, Thréonine, Leucine, Histidine) (**Stadtman & Levine, 2003**). En effet, les protéines sont susceptibles de subir des attaques radicalaires induites par des agents oxydants comme les ERO et le peroxy-nitrite, ce qui favorise leur oxydation entraînant des dysfonctionnements cellulaires (**Dalle-Donne et al., 2003**). Par exemple, les ERO peuvent modifier la pro-caspase-9 qui s'active et se transforme en caspase-9 en déclenchant directement le processus d'apoptose dans la cellule (**Kim & Park, 2003**).

La carbonylation protéique, qui est un marqueur fréquemment utilisé pour évaluer l'état du stress oxydant dans les tissus et les cellules (**Nakamura et al., 2010**), peut également provoquer des altérations des protéines au niveau structural et fonctionnel. Ceci est dû à la formation de protéines carbonylées, des clivages des chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (**Haleng et al., 2007**), qui peuvent induire des agrégats et des perturbations des processus cellulaires normaux tels que la signalisation cellulaires, la réplication d'ADN et la synthèse protéique.

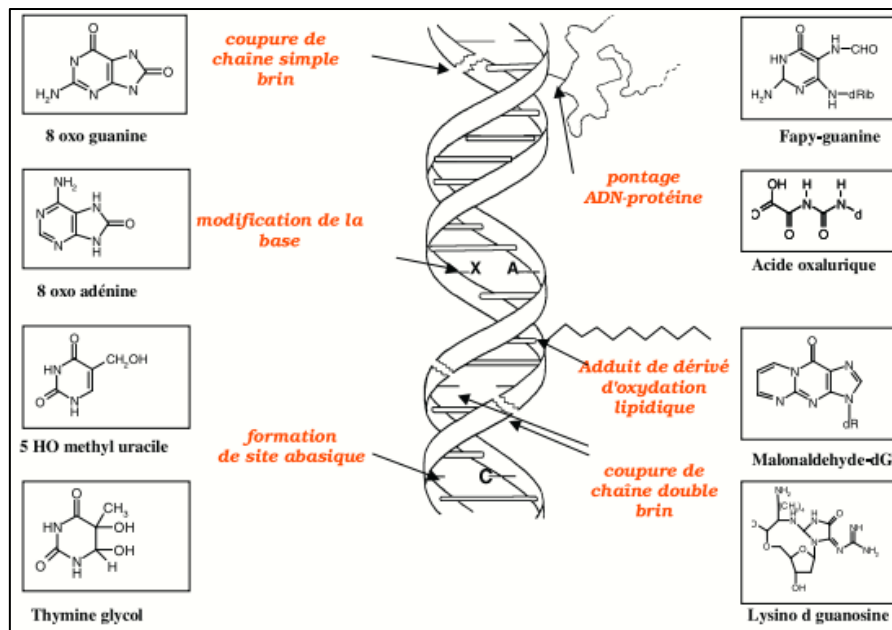
Ces protéines carbonylées peuvent être reconnues et éliminées par un système de dégradation des protéines, y compris l'autophagie et le protéasome. En effet, l'autophagie est un processus de dégradation des protéines qui permet d'encapsuler les protéines endommagées et les livrer aux lysosomes afin de les dégrader, tandis que le protéasome, qui est une grande protéine complexe, sert à dégrader les protéines en petits peptides (**Bollineni et al., 2014**).

Plusieurs modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu lors de la carbonylation protéique permettant la transduction des signaux moléculaires au sein des cascades de signalisations cellulaires (**Hess & Stampler, 2012**). En effet, l'oxydation des protéines favorise la formation des marqueurs dont les plus abondants sont des groupements carbonyles, avec présence d'une double liaison entre les atomes de carbones et de l'oxygène, et la 3-nitrotyrosine qui oxyde une protéine au niveau d'un résidu Tyrosine par réaction d'un ion peroxy-nitrite. Ainsi, l'oxydation protéique engendre l'apparition des S-nitrosoprotéines par une réaction appelée S-nitrosylation (**Pisoschi & Pop, 2015**), et qui est déclenchée quand le monoxyde d'azote (NO) subit une oxydation d'une protéine au niveau d'un résidu de Cystéine (**Wang et al., 2014**).

Des travaux de recherche ont montré que la carbonylation protéique en réponse à un stress oxydant est associée au développement de diverses maladies telles que certains cancers, les maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (**Pisoschi & Pop, 2015**). Dans ce contexte, une étude a révélé que les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des niveaux élevés de carbonylation protéique et de nitration des protéines dans les tissus cérébraux malades, ce qui suggère un lien entre la neurodégénérescence et la carbonylation protéique (**Butterfield et al., 2006**).

### 2.3. Modifications des acides nucléiques

Le stress oxydatif est caractérisé par une perturbation de l'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les systèmes antioxydants qui les neutralisent entraînant un excès des radicaux libres qui peuvent endommager la cellule. Les radicaux libres sont des molécules instables contenant dans leur couche externe un électron non apparié ce qui les rend très réactifs avec d'autres molécules, notamment les acides nucléiques qui sont responsables de la transmission, de l'expression et du stockage de l'information génétique. En effet, suite à un stress oxydatif conduisant à une oxydation des acides nucléiques en particulier la guanine qui est très sensible à l'oxydation, différentes modifications peuvent être provoquées à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et à l'acide ribonucléique (ARN). Ces modifications comprennent des cassures des doubles brins, une altération des liaisons phosphodiester de l'ADN et une formation de liaisons covalentes entre les deux brins de l'ADN (**Figure 8**). Tous ces changements peuvent induire des mutations génétiques, des aberrations chromosomiques et des perturbations du cycle cellulaire. De plus, il est possible d'avoir des liaisons covalentes entre l'ADN et une protéine ou des modifications des bases de l'ADN dont la principale modification des acides nucléiques est la formation de 8-hydroxyguanosine (8-OHG) et de 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OHdG) (**Wang et al., 2014; Li et al., 2018**). De même, une étude a montré l'impact du stress oxydatif sur l'ARN où son oxydation est prédominante dans la maladie d'Alzheimer avec des niveaux d'ARNr et d'ARNm oxydés significativement augmentés (**Wang et al., 2014**).



**Figure 8: Modifications de l'ADN suite à un stress oxydant**

### 3. Dysfonctionnement des organites

#### 3.1. Mitochondries

Les mitochondries sont des organites cellulaires responsables de la survie et de la mort des cellules. Les mitochondries contiennent de l'ADN mitochondrial hérité de la mère. Elles jouent un rôle fondamental dans le métabolisme cellulaire et dans la production d'énergie par la biosynthèse d'adénosine triphosphate (ATP) impliquant la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs ; elles sont aussi impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à longue chaîne (Williams & O'Neill, 2018).

Le dysfonctionnement mitochondrial peut être causé par une variété de facteurs notamment l'altération des processus de la biogenèse et de la dégradation des mitochondries (mitophagie), la perturbation du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), des modifications de l'ADN mitochondrial et des perturbations de l'homéostasie calcique.

La mitophagie est un type spécifique d'autophagie par lequel les cellules sélectionnent et éliminent les mitochondries endommagées afin de maintenir une fonction cellulaire normale. C'est un processus crucial pour la survie cellulaire et la prévention des maladies impliquant les mitochondries. Il existe de multiples voies impliquées dans le déroulement de la mitophagie notamment la voie putative PINK1/Parkin et la voie BNIP3/NIX. La voie PINK1/Parkin est déclenchée lorsque la protéine kinase PINK1 (PTEN-Induced Kinase1) s'accumule sur les

mitochondries altérées puis recrute la protéine E3 ligase Parkin qui cible les mitochondries pour activer la dégradation par autophagie (**Strappazzon et al., 2015; Lazarou et al., 2015**). La voie BNIP3/NIX est initiée par l'expression des protéines BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3) et NIX (NIP3-like Protein X) qui se lie directement aux protéines de la membrane en induisant la mitophagie (**Palikaras & Tavernarakis, 2012; Fang et al., 2019**). Plusieurs facteurs, comme le vieillissement, le stress oxydatif, des mutations génétiques et des modifications post-traductionnelles des protéines impliquées dans la mitophagie peuvent contribuer à des altérations de ce processus. En effet, l'âge, le stress oxydatif, des mutations au niveau des gènes codant pour PINK1, Parkin et BNIP3 et des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitination de ces protéines peuvent conduire à une accumulations des mitochondries endommagées dans les cellules vieillissantes associée à une perturbation de la mitophagie, ce qui peut favoriser le développement de pathologies chroniques comme le cancer, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (**Palikaras & Tavernarakis, 2012; Fang et al., 2019**).

La perturbation de l'homéostasie calcique est une caractéristique clé de la dysfonction mitochondriale. Etant des organites indispensables de la régulation du calcium intracellulaire en raison de leur capacité à prendre en charge les fluctuations rapides du calcium dans les cellules, les mitochondries altérées peuvent perdre cette capacité par la détérioration de la perméabilité de la membrane externe par la sous-expression des protéines Bcl-2 ; ceci conduit à l'activation de protéines pro-apoptotiques entraînant l'altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome C dans le cytosol (**Vander Heiden et al., 1997**), et conduit à la perturbation de la perméabilité de la membrane interne caractérisée par l'ouverture de pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) (**Bernardi et al., 2015**). Les mPTP, permettant la libération du calcium, sont régulés par des protéines telles que la cyclophiline D (CyP D) et l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT). En effet, la liaison de la CyP D à la mPTP favorise l'ouverture des pores, alors que la liaison à l'ANT peut la réguler négativement. Lorsque les mPTP s'ouvrent, le calcium peut sortir des mitochondries provoquant une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol d'où l'altération de l'homéostasie calcique (**Bernardi et al., 2022**). L'ouverture des pores s'amplifie probablement avec l'âge et son activité semble en relation avec certaines maladies neurodégénératives (**Subramaniam & Chesselet, 2013; Hou et al., 2014**). De plus, la perturbation de l'homéostasie calcique peut également être induite par des altérations de la signalisation calcique intracellulaire. En effet, des protéines de signalisation calcique comme la calmoduline

et la calcineurine peuvent réguler la perméabilité des mPTP et la libération des  $\text{Ca}^{2+}$  des mitochondries. La calmoduline peut contrôler la perméabilité mitochondriale externe en interagissant avec les protéines Bcl-2, tandis que la calcineurine régule la perméabilité mitochondriale interne en interagissant avec les protéines régulant les mPTP (CyP D, ANT) (Szabadkai et al., 2006; Woods & Padmanabhan, 2012; Madreiter-Sokolowski et al., 2020).

### 3.2. Peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites cellulaires spécialisés, souvent circulaires (0,1 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) et dépourvus d'ADN, qui se trouvent dans la plupart des cellules eucaryotes (y compris les cellules végétales et animales) sauf dans les érythrocytes et absents chez les procaryotes. Ce sont des organites subcellulaires ubiquitaires impliquées dans divers processus métaboliques notamment la dégradation des acides gras à très longue chaîne via la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytanique. Les peroxysomes interviennent aussi dans la synthèse de certains lipides tels que les éthers de phospholipides (plasmalogènes) et les acides biliaires (Schrader & Fahimi, 2008).

Le vieillissement est l'un des principaux facteurs conduisant à un dysfonctionnement peroxysomal par l'induction du stress oxydant, ce qui provoque un désordre de l'activité peroxysomale et l'apparition des pathologies peroxysomales comme l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD), le syndrome de Zellweger, le syndrome de Refsum (Depreter et al., 2003; Schrader & Fahimi, 2008). La dysfonction peroxysomale est caractérisée par une altération de la biogenèse et de la structure du peroxysome, par des modifications du métabolisme des acides gras et des phospholipides et par une perturbation de l'équilibre RedOx. Le syndrome de Zellweger, qui est une maladie caractérisée par absence de peroxysomes fonctionnels entraînant une accumulation de lipides et de substances toxiques dans les cellules, est causé par des mutations au niveau du PEX1, PEX2 et PEX26 qui sont des gènes responsables de la biogenèse des peroxysomes, codant pour des protéines impliquées dans la formation, la maturation et la division des peroxysomes ; ces gènes sont régulés par des facteurs de transcription PPAR $\alpha/\beta$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha/\beta$ ) sous l'effet de l'activation par la protéine PGC-1 $\alpha$  (PPAR Gamma Coactivateur-1 $\alpha$ ) (Bagattin et al., 2010; Jo & Cho, 2019).

Dans les cellules vieillissantes, des études révèlent que la réduction de l'activité des peroxysomes est liée à la diminution de l'import par le peptide peroxysomal matriciel appelé PTS1 (Peroxisomal Targeting Signal 1) sérine-lysine-leucine (SKL) situé sur l'extrémité

C-terminale de plusieurs protéines peroxysomales et reconnu par PEX5 (**Terlecky et al., 2006; Brocard & Hartig, 2006**). Les peroxysomes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement du foie mais aussi d'autres organes comme le cerveau (**Lizard et al., 2012**). Les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer présentent une diminution de la fonction peroxysomale (**Zarrouk et al., 2015**) avec des niveaux réduits de plasmalogènes associés à des enchevêtrements neurofibrillaires (**Jo & Cho, 2019**).

De plus, les peroxysomes sont également impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC : supérieur ou égal à C22:0 comme C24:0 et C26:0), les acides di- ou tri-hydroxycholestanoïque et l'acide pristanique (**Cipolla & Lodhi, 2017**) et participent aussi aux voies anaboliques telles que la synthèse de l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6  $\omega$ 3), des acides biliaires, du cholestérol et des éthers de phospholipides (**Wanders et al., 2023**). En réponse au stress oxydatif et afin de produire de l'énergie et d'éliminer les ERO, les peroxysomes activent d'une part les enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras telles que la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A) et l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) afin de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs, et d'autre part des enzymes antioxydantes telles que la catalase et la peroxydase pour réguler l'homéostasie RedOx en détoxifiant les ERO (Ferdinandusse et al., 2004; Schrader & Fahimi, 2006; Wanders & Waterham, 2006; Lismont et al., 2015). De ce fait, chez les patients avec des peroxysomes dont la fonctionnalité est diminuée, des taux significativement plus élevés d'AGTLC peuvent être observés dans les zones corticales du cerveau, ce qui peut contribuer à réduire la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et provoquer une accumulation accrue d'amyloïde- $\beta$  dans le cerveau de malade Alzheimer (**Kou et al., 2011**).

### 3.3. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire complexe, composé d'un RE lisse et un RE rugueux associé aux ribosomes. Le RE joue un rôle fondamental dans diverses fonctions biologiques notamment le stockage et la régulation calcique intracellulaire, la synthèse des lipides comme les phospholipides, des stérols et surtout du cholestérol (au niveau du RE lisse) ainsi que des protéines (RE rugueux) ; le RE est aussi impliqué dans les voies de signalisation associé au stress cellulaire (stress du réticulum) (**Ricciardi & Gnudi, 2020; Markovinovic et al., 2022**). Le dysfonctionnement du RE, causé par un stress oxydatif causé par des facteurs environnementaux comme le vieillissement et la carence en nutriments ou par des facteurs génétiques, peut avoir de graves conséquences sur le fonctionnement cellulaire et la santé humaine en perturbant la glycosylation et le calcium intracellulaire conduisant à des

changements de pH et à des accumulations excessives de protéines mal repliées. Ceci stimule la cellule à déclencher une réponse appelée UPR (Unfolded Protein Response) afin de rétablir l'homéostasie du RE (**Sprenkle et al., 2017**). Cette réponse UPR va activer à son tour trois voies de signalisation qui sont PERK (PKR-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 $\alpha$  (Inositol-Requiring transmembrane kinase/Endoribonuclease 1 $\alpha$ ). Ces voies régulent la transduction des protéines et la dégradation de protéines mal repliées (**Carrara et al., 2015; Sprenkle et al., 2017; Ghemrawi & Khair, 2020**). La dysfonction du RE peut être due à des détériorations structurelles et fonctionnelles des protéines qui y sont impliquées comme par exemple la protéine de signalisation eIF2 $\alpha$ , qui régule la transduction protéique au niveau du RE, et qui peut être phosphorylée de manière excessive en réponse aux conditions stressantes ce qui entraîne l'altération ou la surexpression des protéines chaperonnes comme les protéines BiP (Binding Protein) et calnexine conduisant à une réduction de synthèse protéique et une accumulation des protéines non conformes dans le RE (**Ghemrawi & Khair, 2020**). De plus, la réponse cellulaire implique l'activation de protéines chaperonnes telles que les protéines HSP70 (Heat Shock Protein 70) et BiP qui aident à restaurer le repliement des protéines mal repliées. Si le stress du RE persiste, la réponse UPR active la protéine homologue CHOP (C/EBP Homologous Protein) et de la chaperonne GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78), ce qui peut favoriser la mort cellulaire par apoptose (**Huang et al., 2014**). La régulation de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup>, de la qualité et quantité des protéines synthétisées est un processus crucial et bien maîtrisé dont tout dysfonctionnement peut conduire à des maladies graves telles les maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives (**Navas-Madroñal et al., 2019**) et diabète de type 1 (**Yang et al., 2013**).

### 3.4. Lysosomes

Les lysosomes, présents dans le cytosol, sont des petits organites cellulaires délimités par une membrane lipidique. Cette membrane lysosomale comporte des pompes à protons (H<sup>+</sup>) et des canaux ioniques spécifiques aux ions chlorure (Cl<sup>-</sup>) permettant de maintenir un pH intraluminal compris entre 3,5 et 5 indispensable au fonctionnement des hydrolases acides qu'ils renferment. Ces dernières sont des enzymes protéolytiques et hydrolytiques (protéases, glucosidases, lipases, nucléases, phosphatases, sulfatases) responsables de la digestion, dégradation et recyclage des molécules intra- et extra-cellulaires (**Trivedi et al., 2020**).

Ces lysosomes sont des organites sensibles au stress oxydant qui est caractérisé par une surproduction des ERO engendrant une perturbation de l'équilibre RedOx et des modifications post-traductionnelles des protéines lysosomales. Quand les niveaux de radicaux libres augmentent

(sous l'effet par exemple du 7-cétocholestérol ou autres oxystérols toxiques), ces derniers peuvent endommager les membranes lysosomales en induisant : une perméabilité accrue, associée à une accumulation du cholestérol non estérifié dans les lysosomes, une diminution du pH lysosomal (Maor et al., 1995; W. Li et al., 2011; Sudo et al., 2015), et une fuite des enzymes protéolytique dans le cytosol ce qui déclenche une cascade de réactions inflammatoires pouvant entraîner des dommages tissulaires et une inflammation chronique. En effet, l'accumulation du cholestérol s'oppose au processus d'autophagie en empêchant la fusion des lysosomes avec les autophagosomes pour former des autolysosomes (appelés aussi autophagolysosomes) capables de recycler les organites dysfonctionnels tels que les mitochondries, les peroxysomes et le RE dans le cas de macroautophagie, les éléments cytosoliques dans le cas de microautophagie, les protéines mal repliées dans le cas d'autophagie médiée par les chaperones (Fraldi et al., 2010 ; Klionsky et al., 2021). Par conséquent, ces agrégats lysosomaux peuvent être une source de développement des pathologies chroniques liées à l'âge, en particulier l'athérosclérose, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et la dégénérescence maculaire (de Grey, 2002). Le dysfonctionnement lysosomal est caractérisé aussi par un déséquilibre RedOx en modifiant les niveaux de glutathion réduit qui est un tripeptide antioxydant important. Cet épuisement de la concentration de glutathion réduit peut perturber l'homéostasie RedOx et augmenter la susceptibilité des lysosomes face au stress oxydant (Filomeni et al., 2015). Ainsi, le stress oxydant peut induire une réduction ou un blocage des enzymes protéolytiques telles que la cathepsine D et B (Li et al., 2011; Sudo et al., 2015), et peut également altérer la signalisation cellulaire impliquée dans la régulation de la fonction lysosomale en activant la voie de signalisation mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) régulant négativement l'autophagie et la biosynthèse des lysosomes (Filomeni et al., 2015).

#### IV.Oxystérols : Dérivés issus de l'oxydation du cholestérol

##### 1. Biogenèse des oxystérols

###### 1.1.Auto-oxydation

Les oxystérols peuvent être formés au sein des tissus par auto-oxydation du cholestérol qui est un processus complexe influencé par divers médiateurs chimiques ou physiques tels les espèces réactives de l'oxygène, l'ozone, la lumière ultraviolette et les ions métalliques (Vejud et al., 2011). L'oxydation du cholestérol peut avoir lieu dans les membranes plasmiques, cytoplasme, peroxysome, mitochondrie ou dans des structures de transport du cholestérol comme les LDL. En effet, le carbone numéro 7 du cholestérol est l'atome le plus sensible au phénomène d'auto-oxydation en raison de la faible énergie de liaison entre ce carbone et l'atome d'hydrogène



(Iuliano, 2011). Ce processus produit différents composés tels que le  $7\alpha$ - ou le  $7\beta$ -hydroperoxycholestérol qui peuvent à leur tour produire du  $5\alpha,6\alpha$ - ou  $5\beta,6\beta$ -époxycholestérol qui formeront par la suite le cholestérol- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol ; du 7-cétocholestérol (7KC) et du  $7\beta$ -OHC (Figure 9). Le 7KC peut aussi être produit, dans des conditions particulières, par des voies enzymatiques à partir du  $7\beta$ -OHC et réciproquement (Brown & Jessup, 2009). Par ailleurs, par auto-oxydation, le cholestérol peut aussi aboutir à des dérivés oxydés en C4 ( $4\alpha$ -OHC) ou en C6 ( $6\alpha$ -OHC et  $6\beta$ -OHC) (Iuliano, 2011).

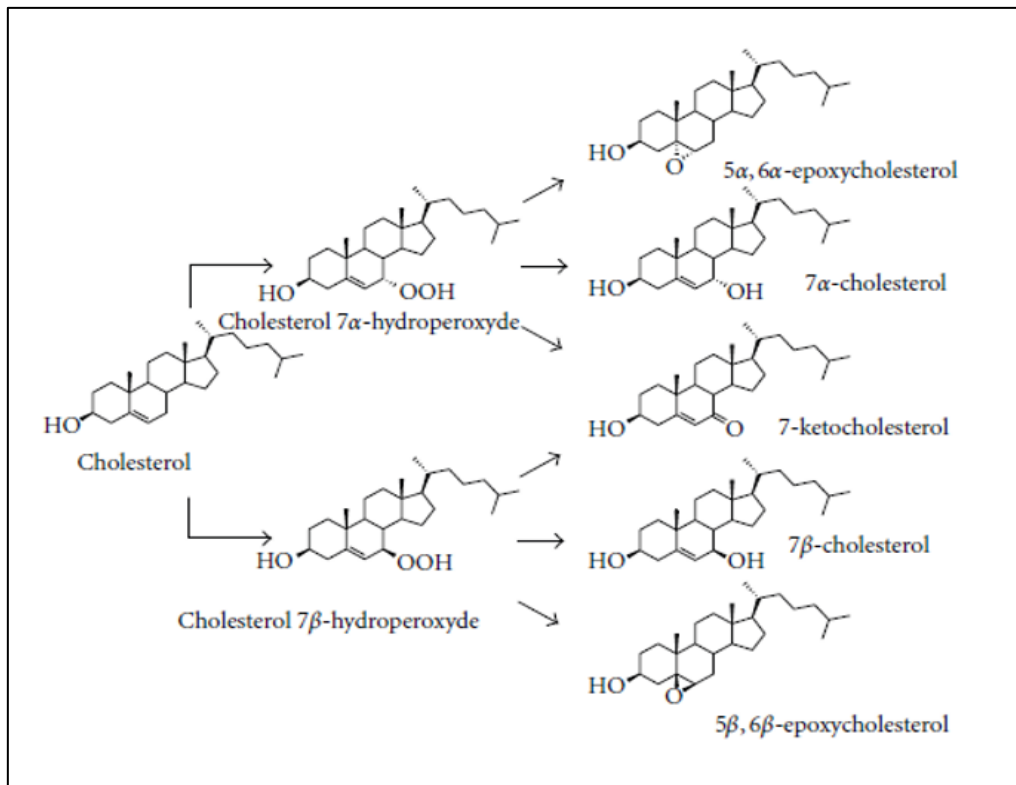
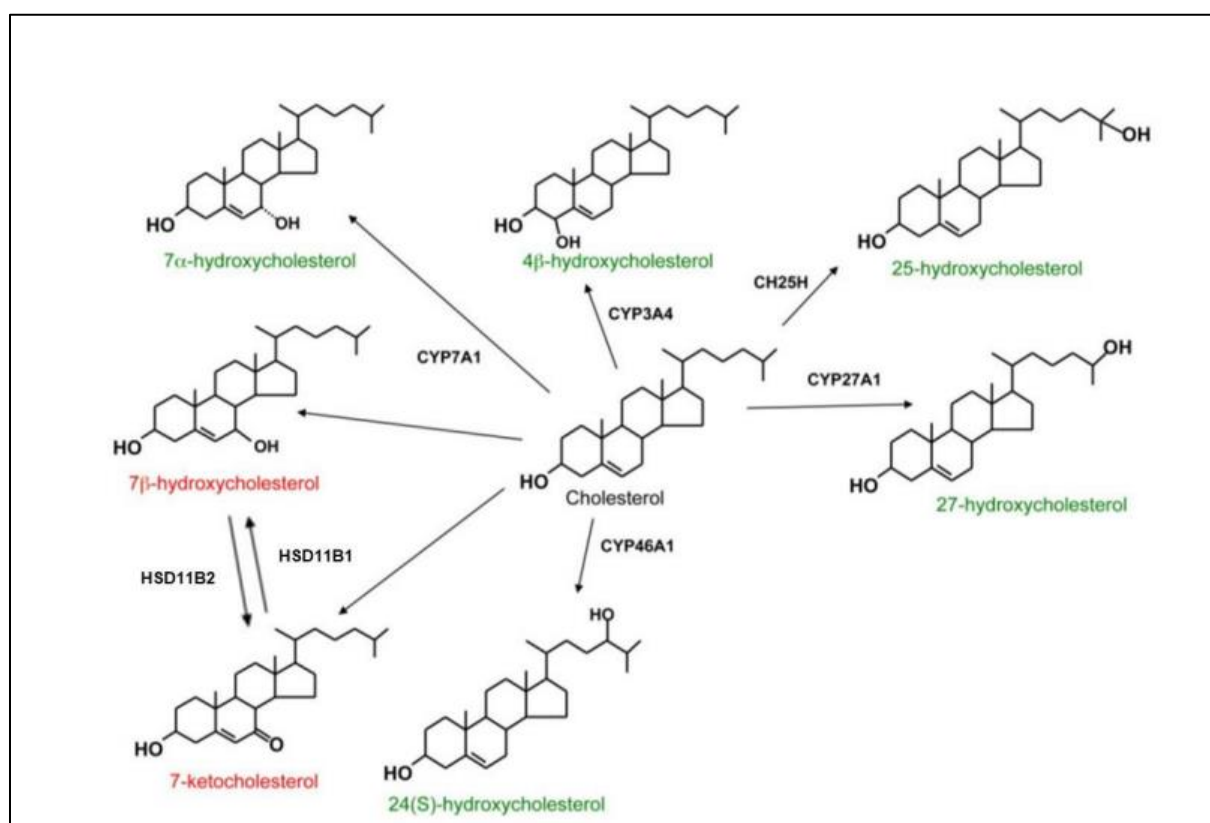


Figure 9: Formation d'oxystérols par auto-oxydation du cholestérol (Vejux et al., 2011)

## 1.2. Voies enzymatiques

La formation des oxystérols peut aussi avoir lieu par oxydation enzymatique du cholestérol dans le foie et des organes endocrines avec des enzymes capables d'oxyder le cholestérol sur des sites différents (Figure 10). Ces enzymes sont généralement impliquées dans les voies du métabolisme du cholestérol et appartiennent à la superfamille des enzymes à cytochromes P450. Parmi les enzymes principales et responsables à la production des oxystérols, il y a CYP27A1 qui est une enzyme mitochondriale exprimée dans divers tissus/cellules tels que le foie, l'endothélium vasculaire et les macrophages (Pikuleva, 2006). Au niveau cérébral, le cholestérol produit par les astrocytes n'est pas capable de franchir la barrière

hématoencéphalique, d'où le rôle du CYP46A1 qui le convertit en 24(S)-hydroxycholestérol ce qui lui permet de passer la barrière hématoencéphalique (BHE) du cerveau vers la circulation sanguine périphérique. L'enzyme CYP7A1, qui est principalement exprimé dans le foie, catalyse la conversion du cholestérol en 7 $\alpha$ -OHC et qui peut à son tour former du 7KC à partir du 7-déhydrocholestérol (Meaney, 2013; Mutemberezi et al., 2016). Le 25-OHC, ayant un impact fondamental dans la régulation du métabolisme du cholestérol en exerçant un rétrocontrôle négatif sur sa synthèse, est un oxystérol issu de la transformation du cholestérol grâce à une enzyme présente majoritairement dans les cellules immunocompétentes (Diczfalusy, 2013). Cette enzyme est appelée cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) et n'appartient pas à la superfamille des cytochromes. Le 25-OHC peut être obtenu avec le 4 $\beta$ -OHC par le CYP3A4 qui se trouve dans le plasma (Nury et al., 2013).



**Figure 10:** Exemples d'enzymes impliquées dans la formation d'oxystérols. Le cholestérol peut être oxydé par différentes enzymes. La CYP3A4 catalyse la formation de 4 $\beta$ -OHC, la CYP7A1 forme le 7 $\alpha$ -OHC (précurseur des acides biliaires), la CYP46A1 forme le 24(S)-OHC (aussi appelé cérébrostérol), la CYP27A1 forme le 27-OHC et la CH25H forme le 25-OHC. La 11 $\beta$ -HSD1 permet la conversion du 7KC en 7 $\beta$ -OHC et le 11 $\beta$ -HSD2 catalyse la réaction inverse (Mutemberezi et al., 2016)

## 2. Activités biologiques des oxystérols

### 2.1. Activités pro-oxydantes

Les oxystérols, qui sont pour certains issus du stress oxydant, peuvent aussi avoir une activité pro-oxydante en raison de leur structure moléculaire qui comprend un groupe hydroxyl (-OH) pouvant réagir avec les molécules d'oxygène pour former des radicaux libres qui sont des molécules hautement réactives et qui peuvent endommager les cellules et les tissus. Les activités pro-oxydantes des oxystérols sont souvent dues aux oxystérols oxydés en C7 (7KC et 7 $\beta$ -OHC) (**Lemaire-Ewing et al., 2005**). En effet, le 7KC provoque un stress oxydant sur des cellules musculaires lisses aortiques humaines en activant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase (NADPH-oxydase) qui est une enzyme impliquée à la production des ERO favorisant l'induction subséquente d'un environnement cellulaire oxydatif (**Leonarduzzi et al., 2006; Brahma et al., 2019**). Ainsi, l'activité pro-oxydante du 7KC est associée à la surproduction des ERO dans des macrophages humains ou dans des lignées cellulaires de monocytes/macrophages telles que THP-1 et U937 (**Brahmi et al., 2019**). De plus, une étude a montré que des rats nourris par un régime alimentaire riche et variés en oxystérols présentent une expression significativement importante d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx), ce qui indique que les oxystérols perturbent le système et les mécanismes de défense antioxydants (**Vejux et al., 2008**).

### 2.2. Activités pro-inflammatoires

Bien que les oxystérols provoquent du stress oxydant et de la mort cellulaire, certains oxystérols peuvent induire de l'inflammation et développer certaines maladies inflammatoires (**Luchetti et al., 2017**). Ceci se traduit par l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 ou encore Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) et Monocyte Inflammatory Protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) (**Vejux & Lizard, 2009; Poli et al., 2013**). Parmi les oxystérols déclenchant la production des cytokines pro-inflammatoires, on trouve le 7KC, le 7 $\beta$ -OHC, le 25-OHC ou encore le 27-OHC. En effet, dans les cellules THP-1 et U937, le 7 $\beta$ -OHC et le 25-OHC peuvent potentialiser la sécrétion de diverses chimiokines telles que TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$  qui sont impliquées dans le recrutement des cellules immunocompétentes au niveau sous-endothélial (**Vejux et al., 2008**). Ainsi, le 27-OHC peut stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des gènes pro-inflammatoires contribuant à la croissance tumorale et à la métastase (**Nelson et al., 2013**). Par ailleurs, le 7KC est un inducteur

d'inflammation conduisant à une augmentation de la production de cytokines inflammatoires. Par exemple, le 7KC présente des niveaux élevés de production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor) sur plusieurs modèles cellulaires, comme les monocytes/macrophages, les cellules rétinienne et les cellules épithéliales intestinales, avec une activation de la voie NF $\kappa$ B, une baisse de la régulation de la protéine kinase (MAPK) (Vejux et al., 2020; Ghzaiel, Sassi, et al., 2022) et une élévation des niveaux de NLRP3 (NOD- LRR- and Pyrin domain containing Protein 3) (Yan et al., 2013), suggérant l'activation de l'inflammasome (Sottero et al., 2018). De plus, le 7KC peut développer une inflammation non cytokinique caractérisée par des niveaux élevés d'acide arachidonique et de l'activité de la phospholipase A2 (Freeman et al., 2005; Ghzaiel, Sassi, et al., 2022). Toutes ces activations peuvent contribuer à la progression des maladies inflammatoires chroniques (Testa et al., 2018).

## 2.3. Induction de la mort cellulaire

### 2.3.1. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus fondamental pour le maintien et le développement des organismes multicellulaires. Il s'agit d'une mort dite de type I (Kroemer et al., 2009). Durant ce processus, la cellule présente une série des changements morphologiques et biochimiques tels que la réduction de sa taille, la fragmentation internucléosomale de l'ADN, la condensation de la chromatine et aussi la formation des vésicules extracellulaires appelées des corps apoptotiques qui sont rapidement phagocytés par les cellules voisines ou les cellules immunitaires (macrophages) (Figure 11).

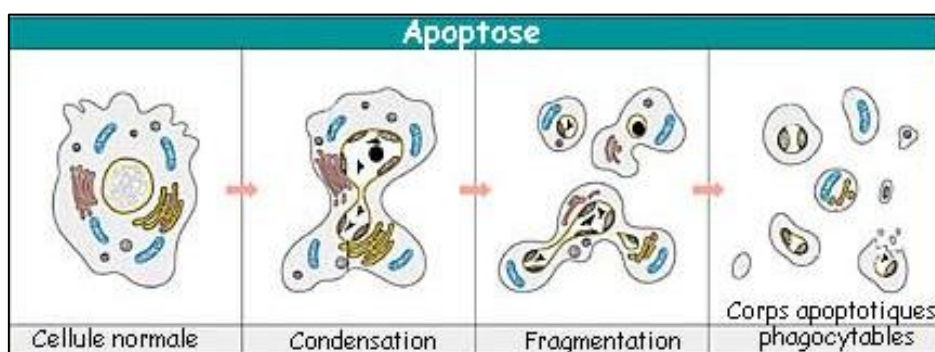
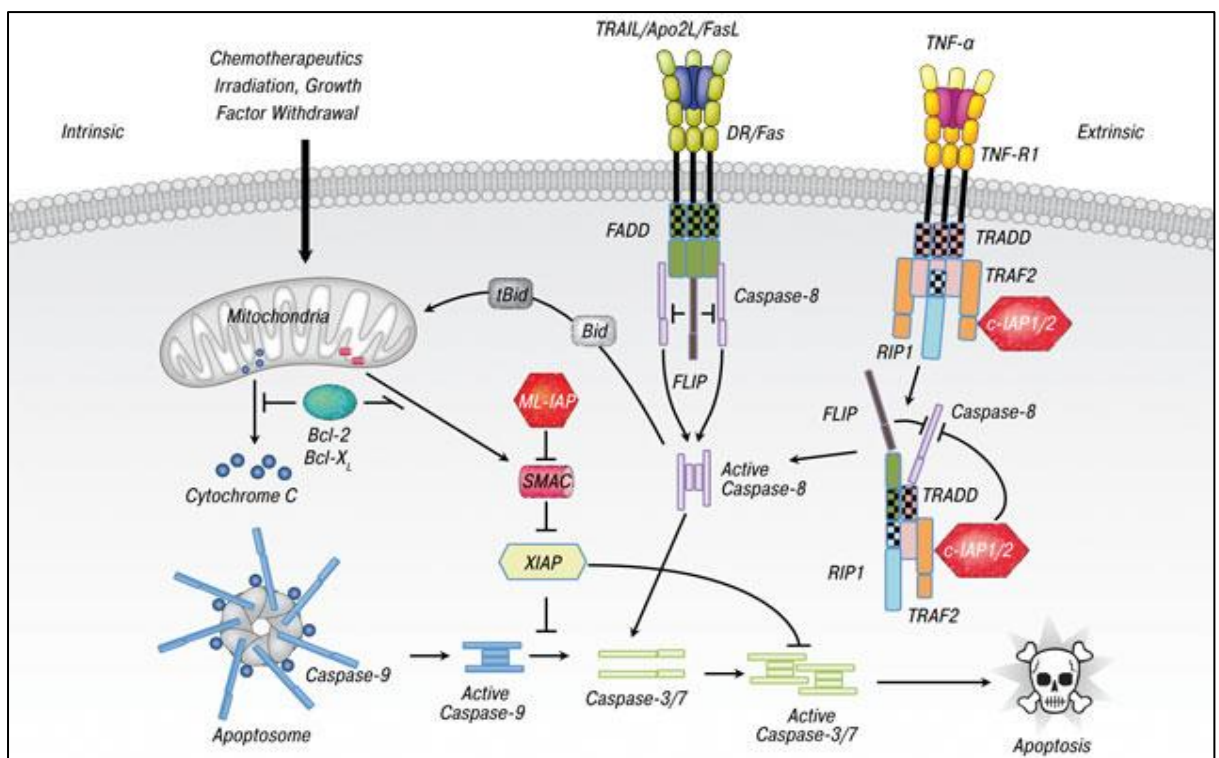


Figure 11: Séquences cellulaires associées à l'apoptose

L'apoptose est un phénomène hautement régulé par deux voies de signalisation (**Figure 11**).

- La première voie est appelée voie intrinsèque. Elle aboutit aux mitochondries et se déclenche quand la cellule subit un stress tel que dommages au niveau de l'ADN, stress mitochondrial, perturbations de l'homéostasie, choc thermique ou signaux extracellulaires. A l'état normal, une activité anti-apoptotique est exercée sur la cellule par la protéine Bcl-2, qui présente l'une des principales protéines régulatrices de l'apoptose, afin de maintenir l'intégrité mitochondriale et d'empêcher le relargage du cytochrome c par la mitochondrie. Dans des conditions stressantes, les protéines pro-apoptotiques, comme les protéines Bax et tBid (Bid est clivé en tBid par la caspase-8), interviennent et se fixent sur la membrane mitochondriale externe en inhibant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (**Adams & Cory, 2007**). La protéine mitochondriale Bak va s'associer à Bax et tBid au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui favorise sa perméabilisation et la formation des pores permettant la libération du contenu inter-membranaire avec notamment le cytochrome c. Ce dernier se complexe avec l'ATP, la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 au niveau du cytoplasme pour former l'apoptosome (**Chipuk et al., 2010**). Par conséquent, la pro-caspase-9 est activée en caspase-9 et celle-ci peut activer la caspase-3 et la caspase-7. La caspase-3 activée va cliver directement des protéines cellulaires comme des kinases nécessaires aux voies de signalisation, des protéines du cytosquelette ou des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Le relargage du contenu mitochondrial libère également l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) facilitant la fragmentation de l'ADN et les protéines Smac/Diablo qui vont inhiber les inhibiteurs d'apoptose (les protéines IAPs) (**Reed, 2000; de Almagro & Vucic, 2012**).
- La seconde voie de signalisation est appelée voie extrinsèque de l'apoptose. Elle est activée par des signaux de l'extérieur de la cellule tels que les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les ligands et les récepteurs de mort membranaires. L'un des principaux récepteurs de la voie extrinsèque de l'apoptose est le récepteur du facteur de nécrose tumorale TNF (Tumoral Necrosis Factor) qui est activé par le ligand TNF- $\alpha$ . L'interaction du ligand TNF- $\alpha$  avec le récepteur TNF va également déclencher une cascade de signalisation entraînant la formation d'un complexe de signalisation nommé complexe I qui contient plusieurs protéines adaptatrices telles TRADD (TNFRSF1A Associated via Death Domain) et TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2). Cependant, le complexe I peut être dévié vers la formation d'un complexe de

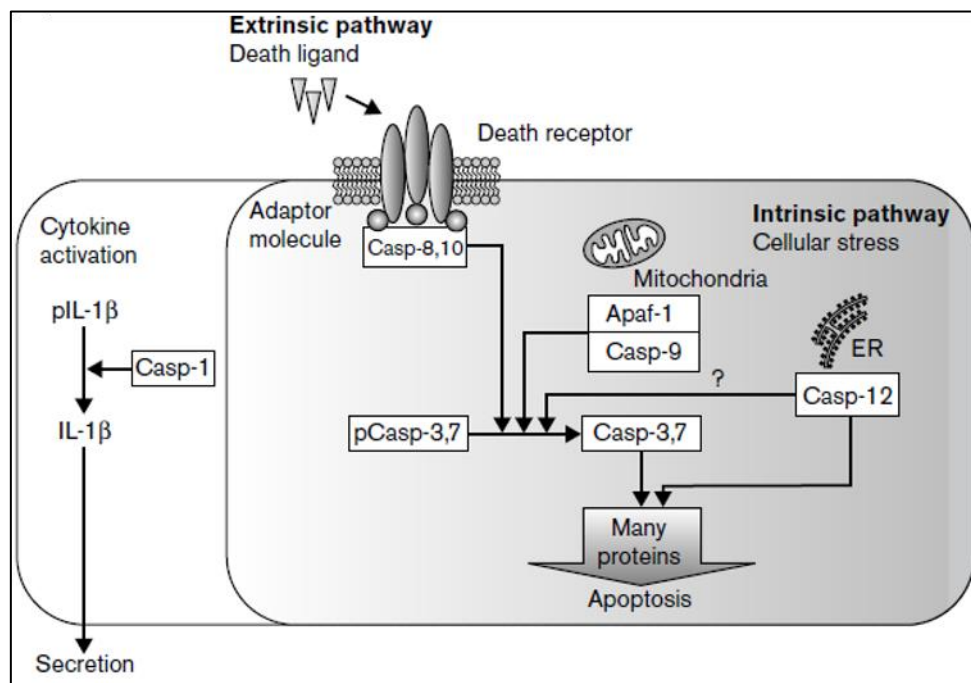
signalisation alternatif appelé le complexe II. Ce dernier est formé lorsque le complexe I fait appel à une autre protéine pro-apoptotique adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain qui recrute à son tour la pro-caspase-8 pour former le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). La pro-caspase-8 est alors activée par auto-protéolyse en caspase-8 en recrutant la caspase-3. Ainsi, la caspase-8 peut cliver la protéine cytosolique Bid en tBid, ce qui conduit à un relargage de cytochrome c par les mitochondries provoquant l'amplification du processus d'apoptose au sein de la cellule en rejoignant la voie intrinsèque (Reed, 2000; Lavrik, 2014) (Figure 12).



**Figure 12:** Schéma de mort cellulaire par apoptose : voie intrinsèque et voie extrinsèque (de Almagro & Vucic, 2012)

Les caspases interviennent dans le processus de l'apoptose (Reed, 2000). Ce sont des protéases à cystéine clivant leur substrat au niveau des résidus Aspartate, et qui peuvent être classées dans différentes catégories selon leur rôle dans le phénomène d'apoptose. En effet, il y a eu les caspases initiatrices (caspase 6, 8, 9 et 10), qui interviennent dans les premières phases de l'apoptose, et les caspases effectrices (caspase 2, 3 et 7) qui sont impliquées dans les dernières étapes de ce processus. De plus, il y a eu les caspases 1, 4 et 5 permettant la maturation des cytokines durant l'inflammation (clivage de pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18). Les caspases inactives sont présentées au niveau du cytoplasme sous forme de pro-caspases qui se clivent en une petite

sous-unité et en une grande sous-unité dès que leur activation est déclenchée et qui forment par la suite des hétérotétramères contribuant à cliver les protéines. Ces hétérotétramères sont composés de deux petites et de deux grandes sous-unités (**Reed, 2000**). Les caspases initiatrices peuvent activer les caspases effectrices. Durant les dernières phases de la voie de signalisation, il y aura l'activation de la caspase-3 où sa forme clivée présente un bon marqueur d'apoptose dans les cellules (**Figure 13**). Des travaux ont révélé que le 7KC provoque l'apoptose entraînant divers effets tels que l'externalisation précoce de la phosphatidylsérine, la déphosphorylation de la Bid avec une dépolarisation de la mitochondrie en libérant du cytochrome c due à l'activation de la calmoduline et de la calcineurine, une internalisation du  $\text{Ca}^{2+}$  plus faible avec un clivage de PARP et des niveaux réduits de Bcl-2 (**Lizard et al., 1999**).



**Figure 13:** Cascade de caspases impliquées dans l'apoptose (**Grütter, 2000**)

### 2.3.2. Nécrose et nécroptose

La nécrose est un phénomène de mort cellulaire non programmée qui survient en réponse à des stimuli nocifs tels que l'hypoxie, l'inflammation et les lésions tissulaires. C'est une mort dite de type III qui se distingue de l'apoptose et de l'autophagie et qui est caractérisée par un gonflement des cellules et des organites, par une rupture de la membrane plasmique par une perte électrochimique et par des dysfonctions mitochondriales conduisant à une surproduction importante d'ERO avec une chute du potentiel transmembranaire (**Figure 14**). Contrairement à l'apoptose, la nécrose n'implique pas d'activation de cascades enzymatiques spécifiques mais

peut entraîner une inflammation et des dommages tissulaires importants. La réponse inflammatoire à la nécrose implique l'activation des cellules immunitaires comme les macrophages qui phagocytent les cellules nécrotiques en produisant des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale pouvant stimuler la prolifération cellulaire, la régénération tissulaire et la production de facteurs de croissance.

Bien que la nécrose soit souvent considérée comme un type de mort cellulaire non régulé, il a été prouvé que les mécanismes de ce processus peuvent être similaires à l'apoptose. Ce phénomène est appelé « Nécroptose » (**Kroemer et al., 2009**), qui implique des récepteurs de mort membranaires (TNFR) et les récepteurs « Toll-like » intervenant à l'initiation de la nécrose suite à l'inhibition de la voie d'apoptose (**Berghe et al., 2014**). Les mécanismes de la nécrose contrôlée comprennent les protéines kinases telles que RIPK1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1) et RIPK3 (Receptor-Interacting Protein Kinase 3) et les inhibiteurs de l'apoptose qui peuvent être des inhibiteurs de caspases (**Galluzzi & Kroemer, 2008; Galluzzi et al., 2009**).

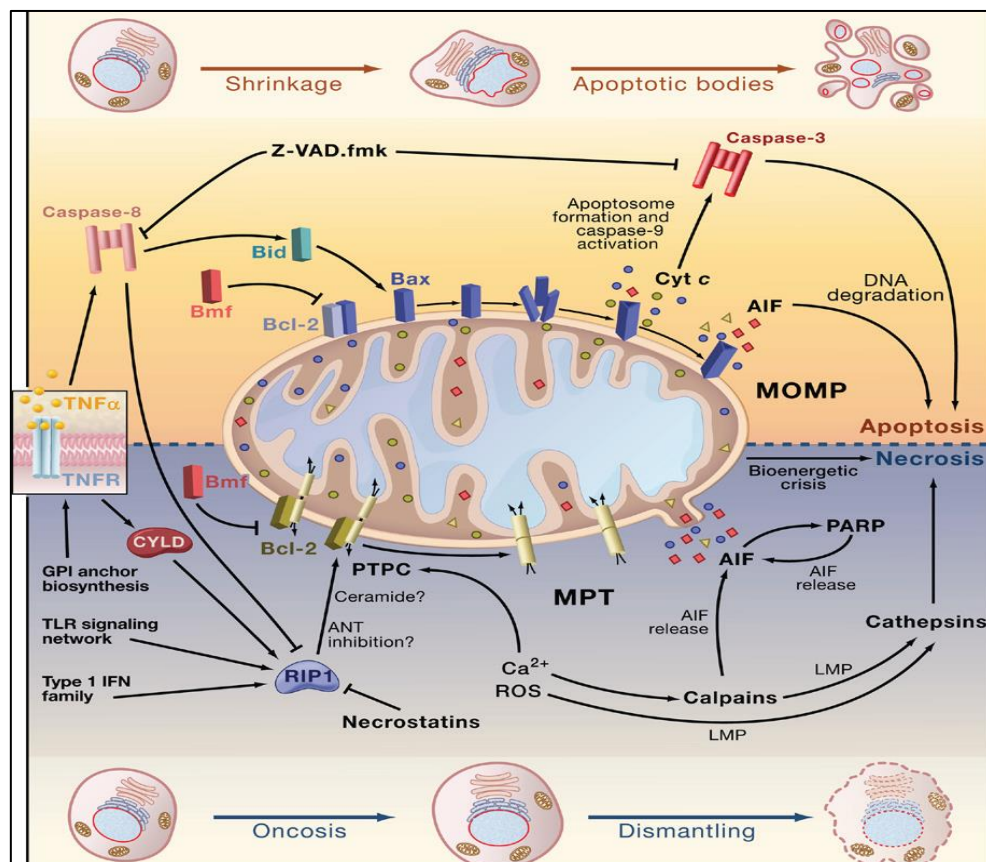


Figure 14: Schéma de la nécroptose (Galluzzi & Kroemer, 2008)

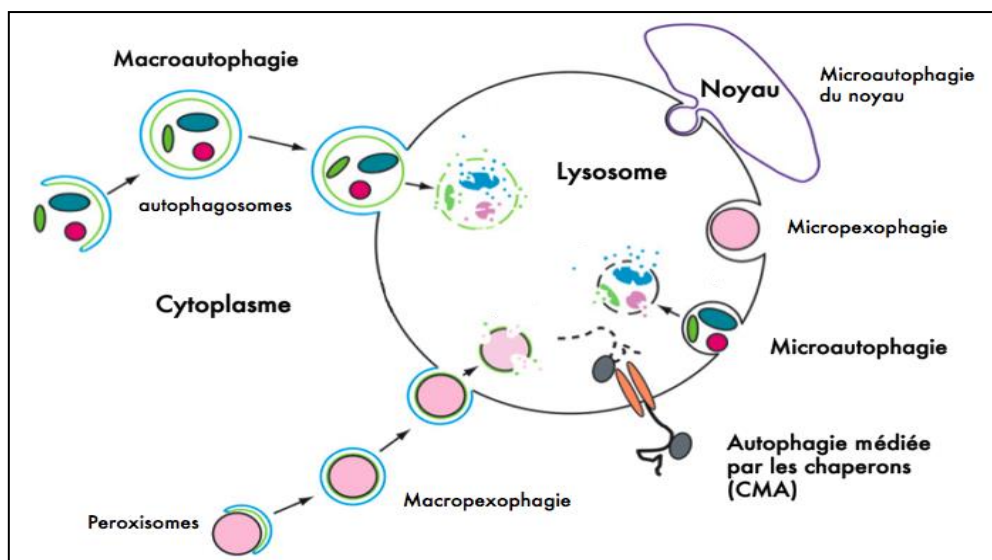


### 2.3.3. Autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage de composants cellulaires permettant aux cellules de maintenir leur homéostasie et leur survie en réponse à des conditions stressantes telles que l'hypoxie et le stress oxydatif. Ce processus est décrit comme la mort cellulaire de type II ; il est à l'origine d'une mort cellulaire impliquant d'autres voies cellulaires que celles de l'apoptose et de la nécrose.

L'autophagie est un processus observé dans tous les êtres vivants (animaux, végétaux, levures). Autophagie signifie littéralement : se manger soi-même. Cela décrit le mécanisme par lequel des cellules peuvent recycler des organites et des protéines présentes dans leur cytoplasme. L'autophagie n'est pas un mécanisme nocif pour la cellule mais plutôt positif qui contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, cette dernière se déclenche dans des conditions de stress pour la cellule comme dans le cas d'un manque de nutriments ou d'un stress oxydant. Elle peut aussi s'activer lors de certaines pathologies ou par action de drogues comme la rapamycine. L'autophagie est également impliquée lors du développement, dans le système immunitaire pour la présentation antigénique ou encore dans l'élimination d'organites et des protéines altérées.

Il existe plusieurs formes d'autophagie (**Figure 15**) :



**Figure 15:** Schéma des différents types d'autophagie : micro-autophagie, macro-autophagie et autophagie médiée par des protéines chaperonnes (J. Huang & Klionsky, 2007)

- L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes. Ces protéines sont Heat shock cognate 70 (Hsc70) et Lysosome-Associated Membrane Protein-2a (LAMP-2a). LAMP-2a est présente sur la membrane des lysosomes et est en interaction avec HSC70. Cette forme d'autophagie permet la dégradation spécifique de protéines présentant un motif peptidique d'adressage dans les lysosomes.
- La micro-autophagie qui correspond au mécanisme par lequel une partie du contenu cytoplasmique (organites, protéines) est directement dégradé dans les lysosomes par invagination de sa propre membrane.
- L'autophagie à proprement parler désigne en fait la macroautophagie. Dans ce cas, une partie du contenu cytoplasmique comme des organites ou encore des protéines sont encapsulés dans des vésicules puis ces dernières fusionnent avec les lysosomes pour permettre la dégradation de leur contenu (**Huang & Klionsky, 2007; Ravikumar et al., 2010**). Dans le cas de la macro-autophagie, une double membrane lipidique englobe les éléments qui seront dégradés dans le lysosome. Le terme d'autophagie s'adapte en fonction de l'organite qui est dégradé. Ainsi, lorsqu'un peroxyosome est dégradé par autophagie on parle de pexophagie, de mitophagie pour une mitochondrie, de nucléophagie pour le noyau, de ribophagie pour les ribosomes, etc...

Différents travaux ont permis d'identifier plus de 30 gènes directement impliqués dans l'autophagie, il s'agit des gènes ATG (autophagy genes) (**Huang & Klionsky, 2007; Ravikumar et al., 2010**). Le processus d'autophagie est composé des plusieurs étapes qui sont la formation de vésicules, l'incorporation du matériel à dégrader, la fusion avec les lysosomes et le recyclage des nutriments par la cellule.

Dans des conditions normales pour la cellule, le complexe mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est relié à ULK1 phosphorylé (UNC-51 like kinase 1). Lorsque les conditions énergétiques sont mauvaises pour la cellule, le taux d'adénosine triphosphate (ATP) diminue et le taux d'adénosine monophosphate (AMP) augmente. Cette situation est détectée par l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) qui active des voies de signalisation visant à augmenter le statut énergétique de la cellule (import du glucose, oxydation des lipides). L'AMPK va également conduire à la déphosphorylation de mTOR qui va se dissocier de ULK1 qui se déphosphoryle aussi à son tour. Cette cascade est à l'origine de la formation des phagophores (**Abounit et al., 2012**). Ces structures sont formées dans le cytoplasme et sont des vésicules présentant une double membrane lipidique dont l'origine

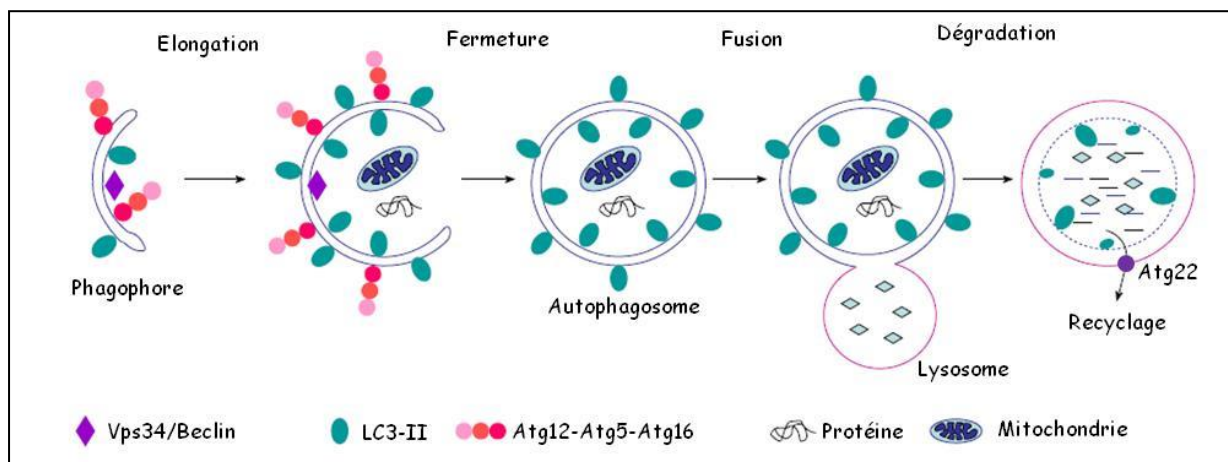
exacte est encore mal connue chez les mammifères. Elle viendrait en partie du réticulum endoplasmique, du Golgi et des mitochondries et de la membrane plasmique. La formation de cette membrane implique plusieurs signaux moléculaires.

La phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K) aussi appelé Vesicular Protein Sorting 34 (Vps34) se lie à Beclin/Atg6. Vps34 permet la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et son activité est augmentée par la liaison avec Beclin/Atg6. La formation de PI3P peut être inhibée par la 3-méthyladénine (3-MA) ou par la wortmannine ce qui bloque la formation des phagophores et donc l'autophagie (**Ravikumar et al., 2010; Glick et al., 2010**). Le rôle exact de PI3P est encore mal connu mais ce dernier est important dans la formation, l'élongation et le recrutement d'autres Atg nécessaires au processus d'autophagie. A ce stade, les phagophores vont encore subir une élongation et une maturation pour devenir des autophagosomes. Cette maturation du phagophore en autophagosome implique deux mécanismes qui se déroulent en parallèle. Le premier est la formation d'un complexe Atg12-Atg5-Atg16L. Ce complexe semble induire le repliement du phagophore sur lui-même pour former une vésicule (**Glick et al., 2010**). Le second mécanisme est le clivage de la Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3). Dans un premier temps, LC3 qui est cytosolique est clivé par Atg4 et devient LC3-I. LC3-I est alors dirigé vers la membrane du phagophore par Atg3 où il se lie avec une phosphatidylethanolamine pour former LC3-II (**Figure 16**). Ainsi, LC3-II est distribué sur la face interne et externe de l'autophagosome. Les protéines LC3-II situées sur la face interne des autophagosomes sont dégradés par les enzymes lysosomales après la fusion avec ces derniers et les protéines situées sur la face externe peuvent être clivées par Atg4 pour redonner LC3-I. La dégradation de LC3-II dans les vésicules d'autophagie peut être inhibée par des inhibiteurs des pompes H<sup>+</sup>-ATPase comme la bafilomycine A1. LC3 est donc un bon marqueur de l'autophagie qui peut être utilisé pour la mettre en évidence. Le rôle précis de LC3-II dans la formation de l'autophagosome est encore mal connu mais il pourrait être impliqué dans l'élongation de la membrane et dans la fermeture de l'autophagosome (**Abounit et al., 2012**). A la fin de la maturation, le phagophore se ferme et devient donc un autophagosome.

Néanmoins, il ne suffit pas que l'autophagosome soit présent pour qu'il y ait autophagie. Des protéines et/ou des organites doivent être inclus à l'intérieur pour qu'ils soient ensuite dégradés. La sélection du matériel cellulaire à dégrader ne se fait pas au hasard dans le cytoplasme. En effet, ce mécanisme implique une protéine particulière qui est p62. Cette protéine présente trois sites de reconnaissance qui sont un domaine UBA (ubiquitin associated), une région LRI (LC3-Interacting Region) et un domaine de multimérisation. Ces trois sites permettent à p62 de

capturer les protéines ubiquitinylées sur son domaine UBA puis de se fixer à LC3-II au niveau de la membrane du phagophore. De plus, grâce au site de multimérisation plusieurs molécules ubiquitinylées peuvent se fixer sur une seule molécule LC3-II. Cette sélection et inclusion du matériel à dégrader à lieu avant la fermeture du phagophore en autophagosome (**Abounit et al., 2012**).

Les autophagosomes doivent ensuite fusionner avec des lysosomes pour que les enzymes lysosomales puissent dégrader leur contenu. Chez les mammifères, cette fusion implique que les autophagosomes formés dans le cytoplasme migrent vers les lysosomes. Cette migration se fait grâce au cytosquelette le long des microtubules et une déstabilisation des microtubules peut inhiber l'autophagie. Lorsque le l'autophagosome fusionne avec le lysosome, la nouvelle vésicule est appelée autolysosome (**Figure 16**). Le contenu enzymatique du lysosome contenant entre autres des protéases permet la dégradation du matériel de la vésicule. La membrane de l'autophagosome est alors détruite par l'Atg15 lipase. Enfin, les produits de dégradation de l'autolysosome sont exportés vers le cytoplasme par la perméase membranaire Atg22 - (**Klionsky et al., 2013**).



**Figure 16:** Déroulement des différentes étapes de l'autophagie (macro-autophagie)  
(**Abounit et al., 2012**)

#### 2.3.4. Sénescence

Le processus d'autophagie, tout comme l'apoptose, s'oppose au vieillissement. La diminution de l'apoptose et de l'autophagie conduit à la sénescence dont l'augmentation favorise le vieillissement.

La sénescence cellulaire est un processus biologique complexe caractérisé par une réponse de croissance cellulaire permanente à diverses conditions stressantes, incluant l'accumulation de lésions d'ADN, le raccourcissement des télomères et d'autres facteurs de stress environnementaux (Childs et al., 2014; Ogradnik et al., 2017). Les cellules sénescents sont incapables de se diviser en s'accumulant dans les tissus et contribuent au vieillissement et à certaines maladies liées à l'âge. Ce processus implique l'activation de multiples voies de signalisation moléculaire, la détérioration de la structure morphologique cellulaire et la production des cytokines inflammatoires (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Coppé et al., 2010; Freund et al., 2010; Xu et al., 2018). En effet, avec l'avancée en âge, la sénescence cellulaire ou l'arrêt de croissance sont déclenchés lorsque les cellules sont exposées à divers facteurs de stress comme les dommages au niveau de l'ADN (indépendamment des télomères), le stress oxydatif et la dérégulation du locus INK4/ARF, et par conséquent l'activation des voies de signalisation régulées par deux protéines appelées p53 et p16INK4a afin d'empêcher la prolifération des cellules endommagées (Coppé et al., 2010). Chez les humains, les niveaux protéiques de p16INK4a et p19ARF s'associent avec l'âge chronologique avec une différence significative en comparant les tissus jeunes par rapport aux tissus âgés (Kumari & Jat, 2021). Dans le vieillissement, l'expression de p16INK4a, les dommages d'ADN, le raccourcissement des télomères provoquent une baisse de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Wang et al., 2013). L'espérance de vie en bonne santé pourrait augmenter par élimination réparatrice des cellules p16INK4a (Baker et al., 2016; Xu et al., 2018). Les cellules sénescents sont définies aussi par des altérations morphologiques caractérisées par un élargissement de la cellule, un aplatissement et un élargissement du noyau et des foyers de protéines de choc thermique appelées corps de sénescence-associés (SAHF : Senescence-Associated Heterochromatin Foci) (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Freund et al., 2010; Aird & Zhang, 2013). Ces changements morphologiques sont liés à l'expression accrue de certaines protéines spécifiques telles que la protéine associée au remodelage de la chromatine HMGB 1 (High Mobility Group Box 1) (Velarde & Demaria, 2016; Jeon et al., 2017) et la protéine de stress HSP 90 (Heat Shock Protein 90kDa) (Kirkland et al., 2017). En revanche, les cellules sénescents (ou cellules zombies) se manifestent par un profil sécrétoire caractéristique qui comprend les interleukines, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), l'IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3) et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$ ) entraînant une inflammation chronique de basse intensité et une propagation de signaux de pro-sénescence dans les tissus (van Deursen, 2014). Ainsi, les cellules zombies présentent une libération et une expression

accrue de certaines protéines telles que la protéine inflammatoire IL-1 $\beta$  et la protéine SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) (Coppé et al., 2010; Jeon et al., 2017). De plus, la sénescence est caractérisée par une accumulation de lésions tissulaires avec un système immunitaire incapable d'exclure les agents pathogènes et les protéines endommagées, ce qui favorise l'inflammation conduisant à certaines pathologies chroniques (Kumari & Jat, 2021).

### 2.3.5. Oxyapoptophagie (« Oxiapoptophagy »)

L'oxyapoptophagie est un processus complexe de mort cellulaire qui est défini par une surproduction d'ERO suite à un stress oxydant (« OXY »), une induction d'apoptose (« APOPTO ») et d'autophagie (« PHAGIE ») (Nury, Zarrouk, et al., 2021). Cette mort cellulaire est stimulée par certains oxystéroïls notamment le 7KC, le 7 $\beta$ -OHC ou encore le 24S-OHC (Nury et al., 2015) dans divers types de cellules telles que les cellules neuronales murines (N2a) (Yamine et al., 2020), les cellules oligodendrocytaires 158N (Nury et al., 2015), les cellules microgliales BV-2 (Debbabi et al., 2017), les cellules souches mésenchymateuses et les cellules monocytaires U937 (Anderson et al., 2019). Des études ont prouvé que le 7KC est un inducteur de l'oxyapoptophagie sur les neuroblastomes murins N2a provoquant une inhibition de la prolifération cellulaire, des altérations mitochondriales, une activation de NADPH-oxydase impliquée à la formation des ERO, induisant ainsi la carbonylation protéique et la peroxydation des lipides mesurée par les niveaux intracellulaires de 4-HNE et une activation des caspases 3, 7 et 9, ce qui conduit à la dégradation de la PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase), une condensation et/ou fragmentation des noyaux et une autophagie évaluée par un rapport LC3 II / LC3 I élevé (Paz et al., 2019; Nury, Yamine, et al., 2021). De même, le 7 $\beta$ -OHC engendre l'oxyapoptophagie en induisant majoritairement les mêmes effets que le 7KC mais avec des chronologies différentes (Sghaier et al., 2019; Vejux et al., 2020; Nury, Yamine, et al., 2021).

A partir de différents types de cellules, plusieurs événements qui se déroulent au niveau des voies de signalisation associées à la toxicité du 7KC (Figure 17).

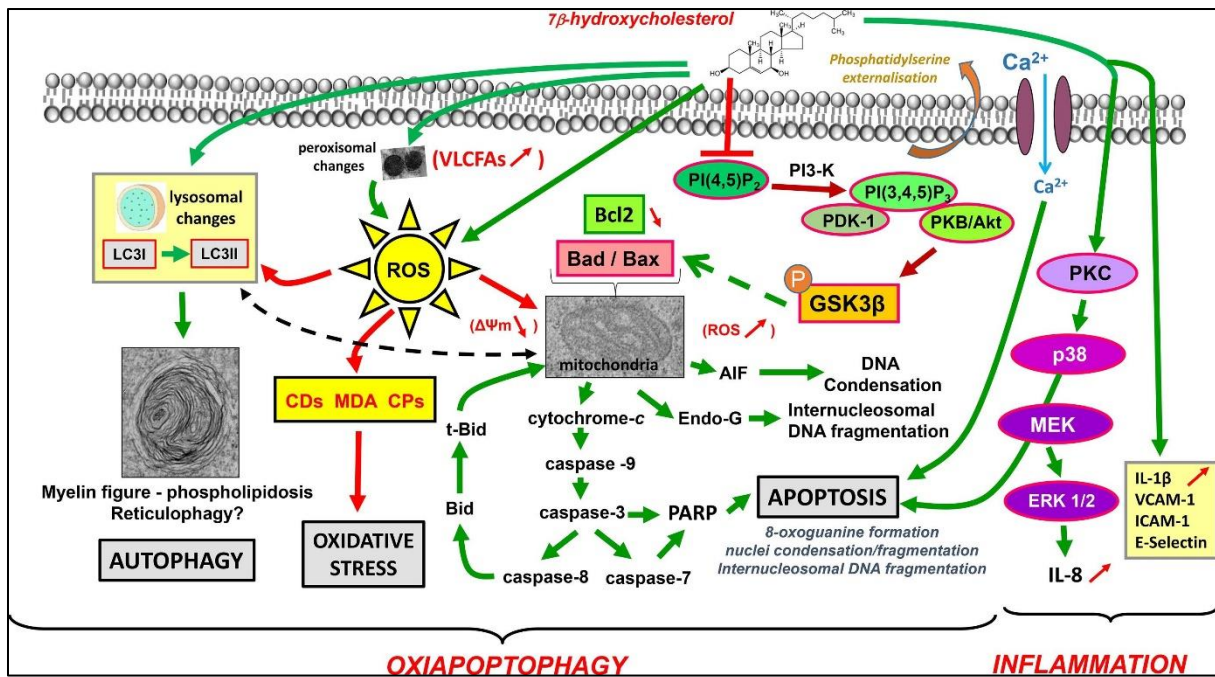


Figure 17: Voies de signalisation associées à la toxicité du 7-cétocholestérol

(Vejux et al., 2020)

Le 7KC s'accumule dans les radeaux lipidiques en déclenchant l'externalisation de phosphatidylsérine et en régulant l'activité des canaux Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> comme les récepteurs P2X7 et Kv3.1 ce qui perturbe les flux calciques et potassiques intracellulaires causés la mort cellulaire (Bezine et al., 2017). Le 7KC stimule notamment le stress oxydant et le RE entraînant des dysfonctions mitochondriales, peroxysomales, lysosomales et des dysfonctionnements au niveau du RE. Ainsi, le 7KC est capable d'inhiber la voie de signalisation PI3-K/PKB/Akt, ce qui contribue à une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). De plus, le 7KC possède une activité pro-inflammatoire via l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , ICAM-1, IL-8, VCAM-1 et E-sélectine par l'activation du récepteur TLR4 (Toll Like Receptor 4) (Huang et al., 2014; Vejux et al., 2020). Cette cascade de perturbations métaboliques causées par le stress oxydant provoquant l'induction de l'apoptose accompagné par l'autophagie se regroupe dans le phénomène d'oxyapoptophagie.

Le processus d'oxyapoptophagie peut aussi être applicable à d'autres oxystérols tels que le 7 $\beta$ -OHC et le 24S-OHC (Nury et al., 2015). Il est important de bien connaître la notion d'oxyapoptophagie présentant un intérêt thérapeutique et pharmacologique dans le but de prévenir ce type de mort dans les pathologies où elle serait impliquée.

## V. Importance du régime alimentaire pour la prévention du vieillissement

### 1. Régime méditerranéen et impact sur le vieillissement

Le régime Méditerranéen (RM) est un modèle alimentaire traditionnel de la région méditerranéenne à savoir les pays du Nord d'Afrique, la France du sud, l'Italie, l'Espagne, la Grèce et le Moyen-Orient. Grâce aux micronutriments et aux oligo-nutriments qu'il fournit, ce régime est considéré comme le modèle alimentaire très équilibré et sain tout comme le régime de l'île japonaise d'Okinawa ; le RM est caractérisé par une consommation élevée de fruits, de légumes, de céréales complètes et d'huiles d'olive et de poisson, et par une consommation modérée de viande (**Román et al., 2019**). Le RM est défini aussi par une consommation en quantités faibles de produits laitiers et d'alcool, principalement de vin rouge conseillé à un verre par jour pour les femmes et à pas plus de deux verres pour les hommes (**Slavin & Lloyd, 2012**). Les composantes clé du RM, qui pourraient contribuer à de nombreux bienfaits pour la santé, sont l'apport élevé en vitamines notamment la vitamine C, la vitamine D et la vitamine E et en minéraux, en acides gras monoinsaturés (AGMI), en acides gras polyinsaturés (AGPI) (oméga-3, acide docosapentaénoïque (DPA), acide eicosapentaénoïque (EPA), acide docosahexaénoïque (DHA)) que l'on trouve dans certains poissons comme les sardines et le saumon, la noix, le soja et le colza et en polyphénols contenus des huiles méditerranéennes. Le RM est riche aussi en antioxydants présents dans les légumes, les fruits et le vin rouge qui sont associés à la réduction des facteurs de risque impliqués au développement des maladies chroniques liées à l'âge (**Mazza et al., 2021**) favorisant aussi une amélioration de la qualité de vie et une longévité accrue (**Trichopoulou & Vasilopoulou, 2000**).

Le RM est devenu un sujet de recherche essentiel ces dernières années en raison de ses nombreux avantages pouvant les offrir à la santé, en particulier pour les personnes âgées (**Tosti et al., 2018**). En effet, plusieurs études ont examiné l'impact de ce modèle alimentaire sur le vieillissement. Par exemple, les AGMI trouvés en grande quantité dans l'huile d'olive comprennent des effets bénéfiques au niveau du système cardiovasculaire en réduisant l'inflammation et le taux de LDL dans l'organisme (**Estruch et al., 2018**). Les fibres alimentaires contenus dans les fruits, les légumes et les grains entiers servent à réguler la glycémie, à réduire le teneur du cholestérol et à améliorer le transit intestinal (**Slavin, 2005**), ainsi la présence des vitamines est primordiale pour maintenir une bonne santé notamment dans le système nerveux et le système immunitaire (**Ames, 2001**). Ainsi, les antioxydants jouent un rôle essentiel dans la prévention des maladies chroniques liées à l'âge en réduisant les dommages oxydatifs dans l'organisme (**Kris-Etherton et al., 2004**). En ce qui concerne la



fonction cognitive et l'inflammation (McGrattan et al., 2019), les bienfaits du RM présentent des effets protecteurs impliqués de réduire le déclin cognitif et l'apparition des maladies neurodégénératives chez les individus âgés avec une diminution significative de l'incidence de ces pathologies (Lourida et al., 2013) accompagnée par une baisse de taux de mortalité (Scarmeas et al., 2007).

## 2. Polyphénols associés au régime méditerranéen

### 2.1. Origine, structure et classification des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille des molécules la plus abondante. Ce sont des molécules bioactives largement présentes dans le règne végétal. De point de vue chimique, ces composés sont constitués par des structures phénoliques définies par un ou plusieurs noyaux aromatiques (la tyrosine et la phénylalanine) (Figure 18).

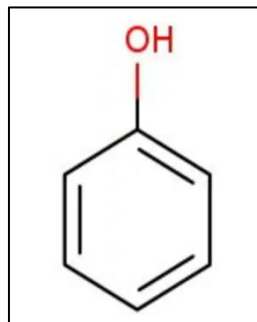


Figure 18: Structure chimique du phénol

Les sources alimentaires qui comprennent les polyphénols sont diverses telles que les légumes (épinards, artichauts, oignons rouges), les fruits (fraises, figues, cerises, dattes, pommes, raisins), les céréales complètes, l'huile d'olive et le vin. Les polyphénols peuvent jouer un rôle important dans la protection des plantes face aux radiations UV, aux attaques microbiennes et aux herbivores en raison de leurs activités antioxydantes (Román et al., 2019). Les plantes ont ainsi développé une grande variété de polyphénols, qui sont caractérisés par la présence de groupes phénoliques avec des structures et de fonctions différentes (Bertelli et al., 2021). Il existe environ 8 000 polyphénols alimentaires qui sont subdivisés en deux classes (Figure 19) : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Jimenez-Del-Rio & Velez-Pardo, 2015). Parmi les flavonoïdes ayant une structure basée un squelette de 15 atomes de carbones et d'un cycle chromane attaché à un second cycle aromatique, on distingue deux sous classes : les anthocyanes et les anthoxanthines. Cette dernière est composée par les flavanols (quercétine, myricétine, kaempférol), les flavanones (naringénine, hespéritine), les flavanols (catéchine), les

flavones (apigénine, lutéoline), les isoflavones (génistéine, daidzéine) et les tannins qui sont des polymères flavonoïdes. Les non-flavonoïdes comprennent essentiellement les acides phénoliques tels que l'acide p-coumarique, l'acide gallique, l'acide férulique et l'acide sinapique, les stilbènes (resvératrol) et les lignanes (Ksila et al., 2023).

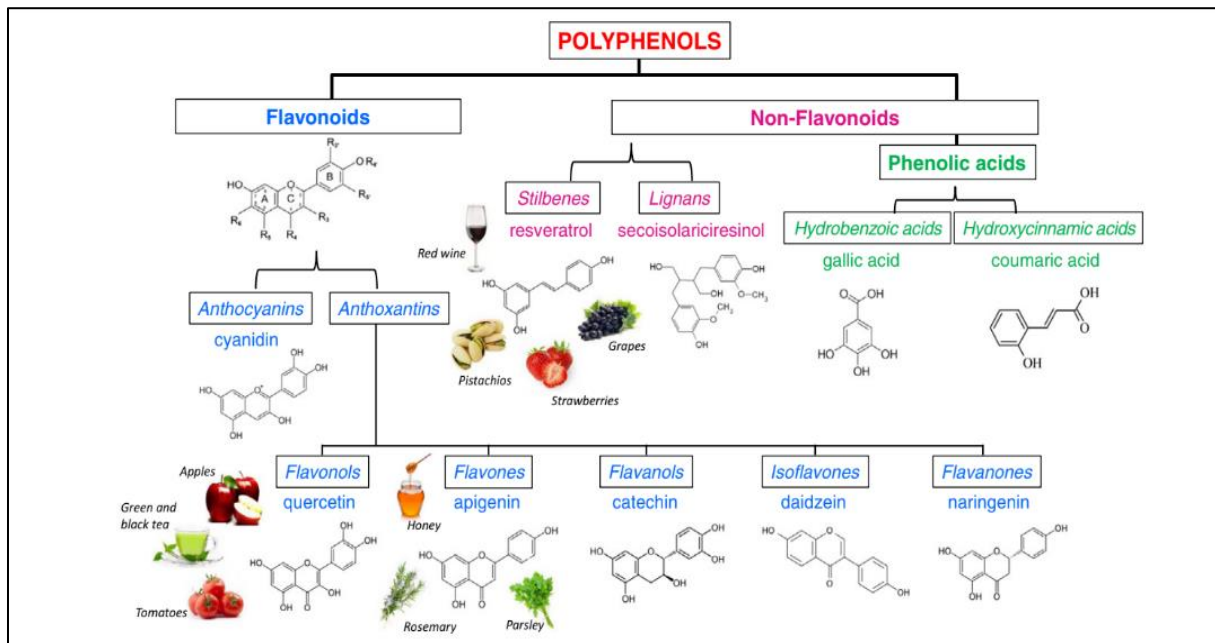


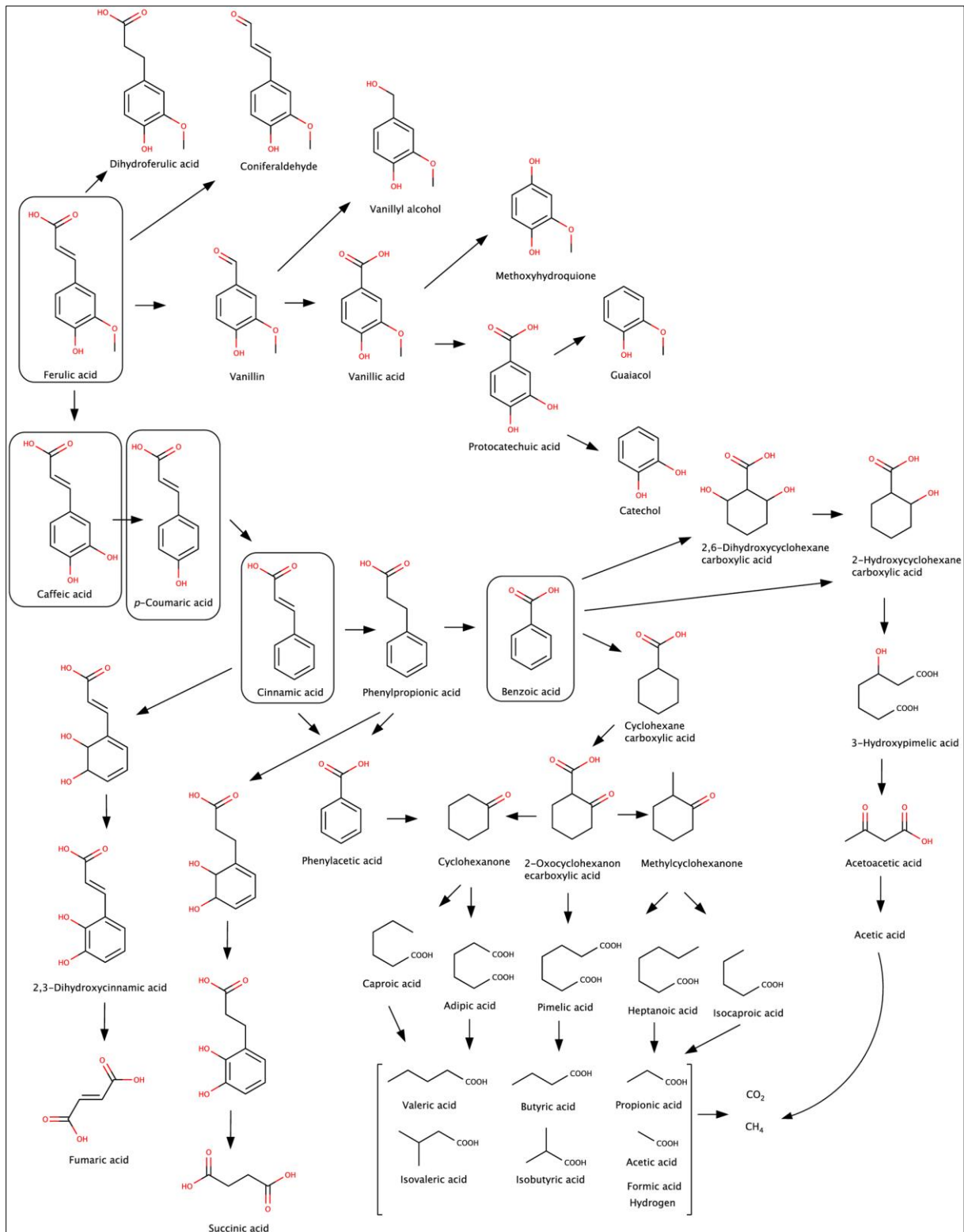
Figure 19: Classification des polyphénols (Ksila et al., 2023)

## 2.2.Métabolisme

Le métabolisme des polyphénols est un processus très complexe et diversifié qui subit une série de réactions biochimiques telles que la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation et l'oxydation (Di Lorenzo et al., 2021). Ces réactions peuvent modifier la structure chimique des polyphénols et leur fonction biologique dont le rôle du microbiote intestinal joue un rôle crucial dans la biotransformation des produits phytochimiques (Bento-Silva et al., 2020).

Les flavonoïdes, stockés naturellement sous forme de glycosides et de conjugués non glycosylés, peuvent être absorbés au niveau de l'intestin grêle de différentes manières notamment par diffusion passive, par un transporteur actif et par endocytose (Manach et al., 2005; Rodriguez-Mateos et al., 2014), et métabolisés par les enzymes de la phase II avant de pénétrer dans la circulation systémique (Crozier et al., 2010), ce qui augmente leur solubilité dans l'eau et leur élimination dans l'urine (Bento-Silva et al., 2020). Une faible quantité de certains flavonoïdes est absorbée dans l'intestin grêle, alors que une proportion importante se diffuse dans le gros intestin où des aglycones et des métabolites conjugués vont être dégradés

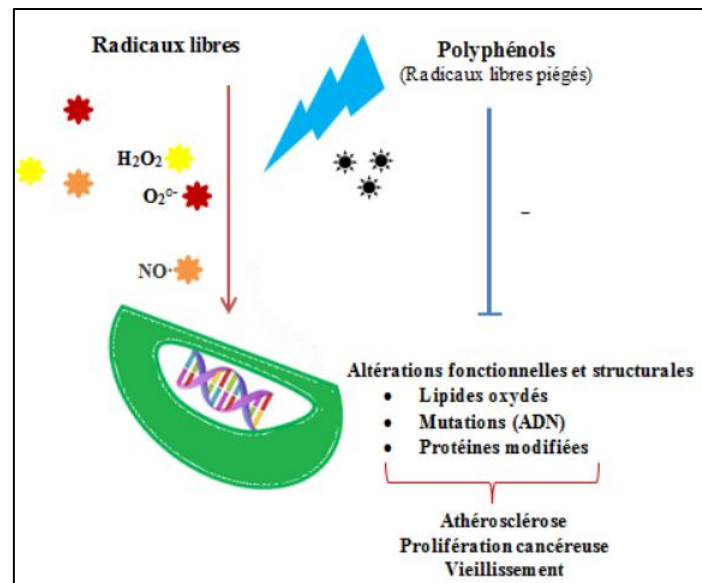
par le microbiote colique (**Aherne & O'Brien, 2002**), ce qui donne des molécules facilement assimilables, y compris les acides phénoliques. En effet, une petite partie des flavan-3-ols du thé vert est métabolisée avant d'être absorbée dans l'intestin grêle tandis que la quantité restante dans le gros intestin est métabolisée par le microbiote formant des acides phénoliques (**Crozier et al., 2010**). Au niveau du côlon, l'acide vanillique est produit par  $\beta$ -oxydation à partir de l'acide dihydrofêrulique qui est le principal métabolite microbien de l'acide fêrulique (**Koistinen et al., 2017**), qui peut être à son tour dégradé en acide caféique et par réduction en acide cinnamique et en acide p-coumarique, en acide caféique (**Figure 20**). Ainsi, la réaction d' $\alpha$ - ou  $\beta$ -oxydation de la chaîne latérale aliphatique conduit à l'accumulation de dérivés de l'acide benzoïque (**Gao et al., 2010**). La quercétine-3-O-rutinoside est initialement absorbée dans le gros intestin, plutôt que dans l'intestin grêle, où de multiples composés méthylés et glucuronidés vont être métabolisés par la microflore colique (**Crozier et al., 2010**).



**Figure 20:** Principales voies de dégradation de l'acide férulique, de l'acide caféique et de l'acide p-coumarique (Bento-Silva et al., 2020)

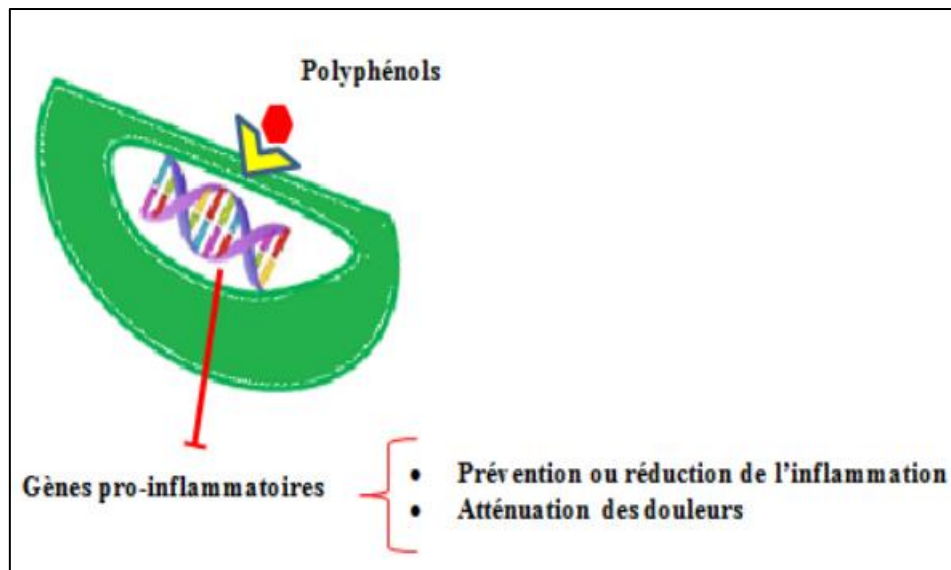
### 2.3. Activités et propriétés biologiques

Les polyphénols sont connus par leurs diverses activités biologiques notamment en interagissant avec des protéines et des enzymes régulant les voies de signalisation cellulaire et modifiant l'expression génique. Leur impact potentiel peut varier en fonction de leurs sources, de leurs doses et de la biodisponibilité des composés. Parmi les propriétés primordiales des polyphénols on trouve le pouvoir antioxydant permettant à l'organisme de neutraliser les espèces radicalaires (oxygénées telles que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ou azotées telles que le  $\cdot\text{NO}$  caractérisés par un électron non apparié très réactif) chimiquement agressives provoquant des pathologies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives (maladies de Parkinson et d'Alzheimer), les maladies cardiovasculaires et certains cancers, et de protéger les cellules face aux dommages oxydatifs. Les polyphénols peuvent aussi affronter l'effet néfaste des agents oxydants (**Figure 21**), à savoir les enzymes pro-oxydantes (peroxydase, xanthine oxydase, lipoxigénase) et les ions métalliques (cuivre, fer). Les polyphénols peuvent également piéger les radicaux libres en arrêtant les réactions en chaînes de la peroxydation lipidique par la libération d'un proton  $\text{H}^+$  afin de former des radicaux libres fortement stabilisés ( $\text{LOO}^{\cdot} + \text{A-H} \rightarrow \text{LOOH} + \text{A}^{\cdot}$ ) (**Cai et al., 2004**), et en chélatant les ions ferriques par réduction de la réaction de Fenton empêchant l'oxydation (**Tsao, 2010**). Outre le piégeage des ERO et des ERA et la chélation métallique, ces composés phénoliques comme le resvératrol sont définis comme agent antioxydant puissant en raison de la capacité de capter les ERO et d'activer des enzymes antioxydantes telles que SOD, Catalase, Hème oxygénase 1 et Glutathion peroxydase (**Xia et al., 2017**). Ces effets régulateurs des polyphénols sont reliés à leurs structures chimiques particulières contenant de nombreuses fonctions hydroxyles aromatiques conjuguées à une double liaison avec un cycle benzénique. De même, les flavonoïdes, tels que l'épigallocatechine gallate (EGCG), qui est une catéchine trouvée dans le thé vert, peuvent protéger les cellules contre les dommages oxydatifs et prévenir la mort par apoptose (**Cai et al., 2004; Lin et al., 2005; Khan & Mukhtar, 2018**).



**Figure 21:** ERO et ERA neutralisées par des polyphénols

Par ailleurs, les polyphénols présentent des capacités anti-inflammatoires d'où le bénéfice médicamenteux de la nutrition riche en polyphénols qui permet de lutter contre les maladies liées à l'âge comme les maladies neurodégénératives, le cancer de la peau et le vieillissement cutané (Khan & Mukhtar, 2018) (Figure 22). Par exemple, le resvératrol peut exercer des effets anti-inflammatoires afin de lutter contre le mélanome (Heo et al., 2018), en inhibant la phospholipase A2, la cyclogénase et la lipoxygénase entraînant une inhibition de la production de plusieurs médiateurs chimiques tels que les interleukines, les prostaglandines et les leucotriènes et une réduction de la production de TNF- $\alpha$  et de l'oxyde nitrique (NO) (Chimento et al., 2021). De plus, une étude a montré que le traitement des cellules de mélanome (A375 et B16F10) par des polyphénols de thé vert empêche la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses en inhibant l'expression de TLR4 qui est fortement exprimé dans les mélanomes et en stimulant à la fois les lipopolysaccharides agonistes de TLR4 (Khan & Mukhtar, 2018). Les polyphénols inhibent aussi les MAPK comme ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated protein Kinase), qui contrôle le TNF- $\alpha$  et l'iNOS (inductible Nitric Oxide Synthase), ou p38 (Yahfoufi et al., 2018). D'autres études ont suggéré que les polyphénols du curcuma, tels que le curcumine, (Jurenka, 2009; Aggarwal et al., 2013) et les composés phytochimiques de l'huile d'olive avec ses acides gras monoinsaturés (Gorzynik-Debicka et al., 2018) régulent les cytokines pro-inflammatoires en inhibant NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  et IL-6 et l'acide arachidonique.



**Figure 22:** Effet anti-inflammatoire des polyphénols

Le vieillissement se caractérise par des troubles cérébraux entraînant une chute quantitative des neurones, des perturbations de la fonction cognitive liées à divers facteurs comme la neuro-inflammation et le déséquilibre des systèmes de défenses antioxydants endogènes (**Spires & Hyman, 2005**). Dans ce cas, des travaux cliniques et épidémiologiques prouvent qu'une nutrition riche essentiellement en polyphénols joue un rôle fondamental dans l'amélioration des fonctions cognitives et dans le ralentissement des pathologies chez les personnes âgées (**Beking & Vieira, 2010**), ce qui reflète que les polyphénols tels que le cacao (**Scholey et al., 2010**), la myrtille (**Williams et al., 2008**) et le thé (**Chan et al., 2006; Li et al., 2009; Khan & Mukhtar, 2018**) possèdent des bienfaits sur les performances cognitives et l'apprentissage chez les individus âgés afin de protéger les cellules neuronales contre la détérioration causée par des neurotoxines (**Letenneur et al., 2007**). Les propriétés neurotrophiques et neuro-différenciatrices des polyphénols ont été bien étudiées. En effet, les fraises riches en flavanols, les myrtilles riches en anthocyanes qui provoquent des changements durables dans l'hippocampe et dans la plasticité synaptiques (**Ramirez et al., 2005**) et qui sont en relation de l'activation d'un facteur de transcription CREB (**Impey et al., 1998; Williams et al., 2008**), peuvent moduler les fonctions motrices ainsi que la mémoire à court terme (**Ramirez et al., 2005**) et à long terme (**Casadesus et al., 2004**).

Les polyphénols ont également montré un potentiel anti-cancéreux. En effet, l'acide ellagique, qui est un polyphénol présent dans les fruits rouges, peut inhiber la croissance des cellules cancéreuses et la mort cellulaire programmée en modifiant l'expression des gènes (environ 37

gènes) impliqués dans la carcinogenèse orale induite par le DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) (Ismail et al., 2016).

Ainsi, les polyphénols se distinguent par une activité cardioprotectrice en régulant la fonction endothéliale et en réduisant l'inflammation et l'oxydation contribuant au développement des maladies cardiovasculaires. Une étude a montré que les polyphénols du vin rouge, tels que le resvératrol, peuvent améliorer la fonction endothéliale avec une élévation de la production d'oxyde nitrique et une réduction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales (Bondonno et al., 2012).

Il est important de noter qu'une alimentation riche en polyphénols, en particulier en fruits, légumes et céréales complètes, est associée à des bienfaits durables pour la santé et peut également réduire le risque de l'apparition de multiples maladies chroniques.

#### 2.4. Resvératrol

Le trans-resvératrol (RSV) ou 3,4,5'-trihydroxystilbène est un polyphénol naturel qui appartient à la famille de la classe des stilbènes. Seule la forme trans du resvératrol, qui est prédominante, est bénéfique. Ce stilbène, de poids moléculaire de 228,2 g/mol, est un composé non-flavonoïde présentant une structure carbonée particulière en C6-C2-C6 (Figure 23). Ce composé phénolique, qui a été isolé pour la première fois à partir des racines d'hellébore blanc (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), se trouve naturellement dans diverses plantes notamment les fraises, le raisin, le cacao, les tomates, la canne à sucre (Pyo et al., 2020) et dans le vin rouge (Castaldo et al., 2019).

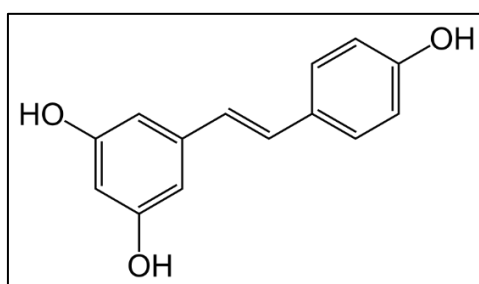


Figure 23 : Structure chimique du resvératrol (Pyo et al., 2020)

Cette molécule a suscité un intérêt considérable en raison de ses propriétés pharmacologiques, notamment ses effets anti-oxydants, anti-inflammatoires, anti-neurodégénératifs, anticancéreux, antimicrobiens et cardioprotecteurs (Malaguarnera, 2019). Le RSV intervient



dans le piégeage du peroxyde d'hydrogène et la chélation des métaux et peut être utilisé pour prévenir l'oxydation lipidique et retarder la formation de produits d'oxydation. Il module aussi des enzymes telles que les lipoxygénases et les cyclo-oxygénases, inhibe l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) par inhibition de la protéine kinase C (PKC) contribuant à la production des molécules pro-inflammatoires (Pyo et al., 2020). De plus, la phosphodiésterase (PDE), induisant l'autophagie par l'augmentation des niveaux de  $Ca^{2+}$  (favorisant Nrf2) et d'AMPc (favorisant AMPK), est inhibée par le RSV (Figure 24). L'effet anti-vieillessement du RSV est défini par l'activation du SIRT-1 qui inhibe la phosphorylation de  $NAD^+$  activant PGC-1 $\alpha$  (co-activateur du récepteur-gamma activé par les proliférateurs des peroxyosomes) (Malaguarnera, 2019).

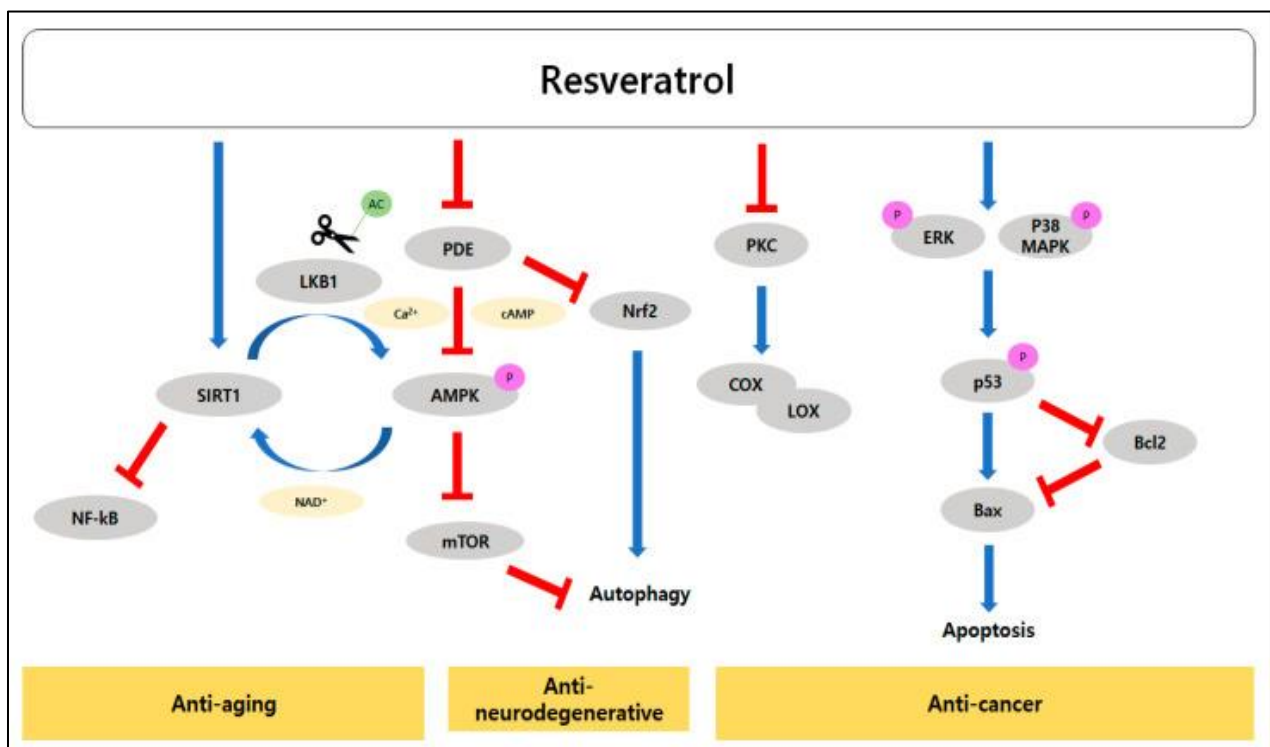


Figure 24: Effets du trans-resvératrol sur les voies de transduction du signal cellulaire

(Pyo et al., 2020)

Par ailleurs, le RSV présente une activité cardioprotectrice en améliorant la fonction endothéliale par la baisse de la pression sanguine de la formation des caillots sanguins et la diminution de l'oxydation des lipides, ce qui peut réduire le risque des maladies cardiovasculaires (Chaplin et al., 2018). Le RSV peut également exercer des effets anticancéreux par une inhibition significative de la prolifération, l'invasion et la migration des

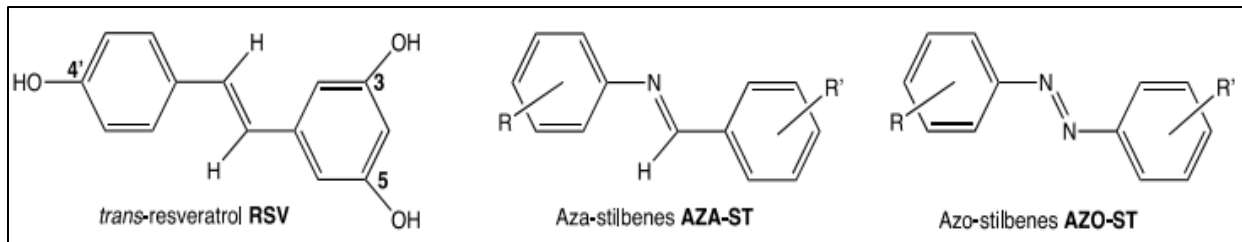
cellules cancéreuses en induisant l'apoptose sur ces cellules par l'activation de caspase-3 et AMPK et en endommageant la glycolyse (Pyo et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Ce stilbène est synthétisé par plus de 70 espèces de plantes par la resvératrol synthase dans les voies des phénylpropanoïdes en raison de son efficacité antimicrobienne et antibiotique. En effet, le RSV joue un rôle majeur dans les mécanismes de défenses chez les plantes (phytoalexine) face aux facteurs stressants, tels que les infections bactériennes et fongiques, les blessures, les infections et les irradiations UV, en exerçant une cascade de réactions biochimiques (Latruffe & Rifler, 2013; Galiniak et al., 2019)..

## VI. Nutrithérapie

Les polyphénols, présents dans de nombreuses plantes ont une grande variété de propriétés biologiques (Quideau et al., 2011). Parmi eux, les stilbénoloïdes phénoliques occupent une place considérable dans le domaine des molécules bénéfiques pour la santé dont le RSV. Ce dernier est un composant majeur du régime méditerranéen ; c'est une molécule aux activités biologiques thérapeutiques pléiotropiques dans le traitement des maladies liées à l'âge (Colica et al., 2018).

Malgré ses caractéristiques physicochimiques et ses potentiels biologiques intéressants, les polyphénols, en particulier le RSV, présentent l'inconvénient d'être peu stables et rapidement métabolisés et dégradés tant au niveau intestinal, sous l'influence de microbiote, qu'au niveau sanguin (Yamine et al., 2021). Par conséquent, la biodisponibilité modérée du RSV ne permet pas de le considérer comme une molécule parfaite, et nous a mené à rechercher des dérivés synthétiques innovants et pertinents du RSV. La synthèse d'analogues isostériques du RSV a été réalisée dans le but d'obtenir des molécules dont le catabolisme est moins important que celui du RSV en augmentant leur solubilité dans l'eau. Il s'agit des aza-stilbènes et des azo-stilbènes pour lesquels la liaison C=C, entre les anneaux a été respectivement substituée par des liaisons C=N ou N=N tout en conservant la squelette stilbénoloïde initial (Lizard et al., 2020) (Figure 25).



**Figure 25:** Structure chimique du resvératrol, des aza-stilbènes (AZA-ST) et des azo-stilbènes (AZO-ST) (Ksila et al., 2022)

Comme le trans-RSV, les AZA-ST et les AZO-ST pourraient avoir un intérêt thérapeutique. Ces molécules peuvent contrecarrer l'agrégation des protéines  $\beta$ -amyloïdes présentant un facteur majeur de la neurodégénérescence (Rana et al., 2018), et peuvent aussi inhiber les cholinestérases (Biscussi et al., 2020) dont l'augmentation engendre une baisse de l'acétylcholine associée à un déclin cognitif et à des troubles comportementaux (Giacobini et al., 2022).

## VII. Aromathérapie et huiles essentielles

### 1. Définition

L'aromathérapie est une pratique de médecine alternative afin d'améliorer et de promouvoir la santé et bien-être (Setzer, 2009). Le terme « aromathérapie », qui a été inventé par le chimiste et le parfumeur français René-Maurice Gattefossé, vient du latin « aroma » signifiant odeur et du grec « therapeia » signifiant traitement (Buchbauer & Jirovetz, 1994). Cette thérapeutique utilise des huiles essentielles (HEs) qui sont des extraits volatils, concentrés et odorants, obtenus à partir de la matière première végétale (fleurs, racines, tiges, feuilles, grains, écorce, bois) (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2017). Chimiquement, les HEs sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés chimiques différents (Jugreet et al., 2020).

Une définition des HEs a été proposée, en octobre 1987, par l'AFNOR (Association Française de la Normalisation). Elle désigne : « *Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention, elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition* ».

Actuellement, il existe environ 3 000 huiles essentielles qui sont identifiées dont 300 ont un intérêt en raison de leur richesse en biomolécules bioactives, en particulier celles qui ont un pouvoir anti-oxydant, anti-inflammatoire, antibactérien et antiseptique (**Kar et al., 2018a**).

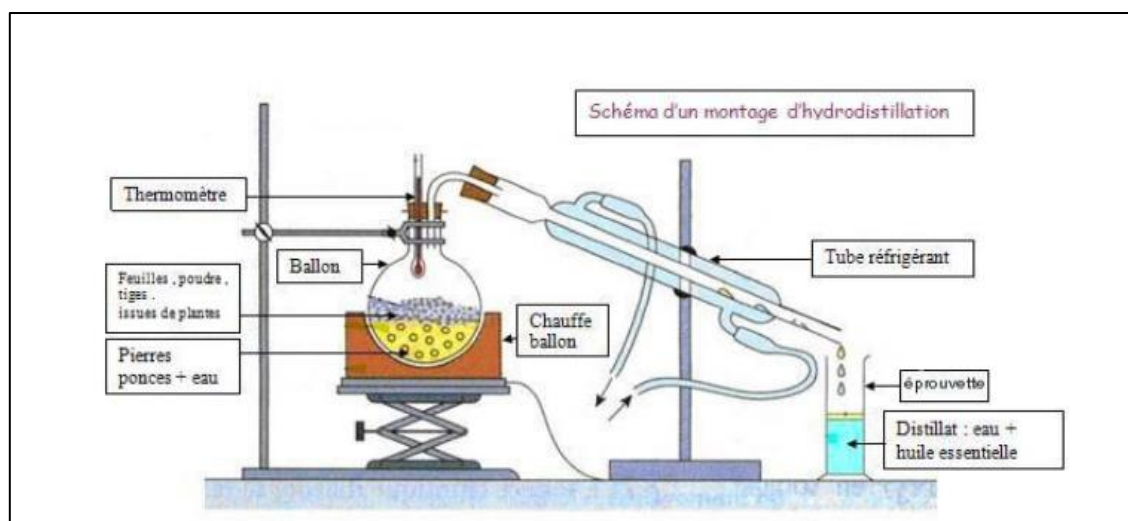
Les HEs sont des produits qui se différencient des autres huiles par leur composition complexe et leurs propriétés physiques du fait qu'elles s'évaporent à température ambiante. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Elles sont hydrophobes, facilement oxydables par la lumière, l'air et la chaleur, et solubles dans les solvants organiques (alcool, acétone, éther ... ) (**Sköld et al., 2006**).

## **2. Sources et procédés d'extraction des huiles essentielles**

Il existe diverses méthodes d'obtention des HEs hautement concentrées telles que l'hydrodistillation, l'extraction par solvants, l'expression à froid et l'enfleurage et qui sont utilisées commercialement pour séparer les huiles essentielles, ayant chacune ses avantages et ses inconvénients en termes de qualité, d'efficacité et de coût.

### **2.1. Hydrodistillation**

C'est la méthode la plus simple et la plus courante pour extraire les HEs qui a été décrite la première fois par Avicenne (980-1037) en extrayant l'huile essentielle pure de la rose en utilisant l'alambic (**Asbahani et al., 2015**). L'hydrodistillation peut être utilisée pour extraire des HEs des plantes entières, de parties spécifiques de plantes telles les fleurs, les racines, les feuilles ou les tiges. Cette technique d'hydrodistillation, équipée d'un dispositif de type Clevenger, consiste à immerger la matière végétale dans l'eau puis à chauffer dans un ballon. La vapeur d'eau, dirigée sur les plantes dans une chambre de distillation, s'écoule vers un condensateur jusqu'à la libération des composés aromatiques volatils (**Gavahian & Farahnaky, 2018**). La vapeur d'eau et les HEs sont ensuite recueillies dans le condensateur où elles se séparent naturellement ; la vapeur d'eau est récupérée pour être réutilisée alors que l'HE peut être récupérée dans une solution alcoolique prête pour la mise en bouteille (**Figure 26**). Cependant, cette opération est caractérisée par une consommation importante d'énergie et des températures élevées. Par conséquent et en raison de son intérêt croissant ces dernières années, plusieurs modules ont été développés et ont été améliorés comme l'hydrodistillation accélérée par micro-ondes, l'hydrodistillation comprimée par micro-ondes, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes et l'hydrodistillation sous vide par micro-ondes (**Singh Chouhan et al., 2019**) dans le but de favoriser les économies d'énergie et de temps (**Gavahian & Farahnaky, 2018**).



**Figure 26:** Principe de la technique d'hydrodistillation

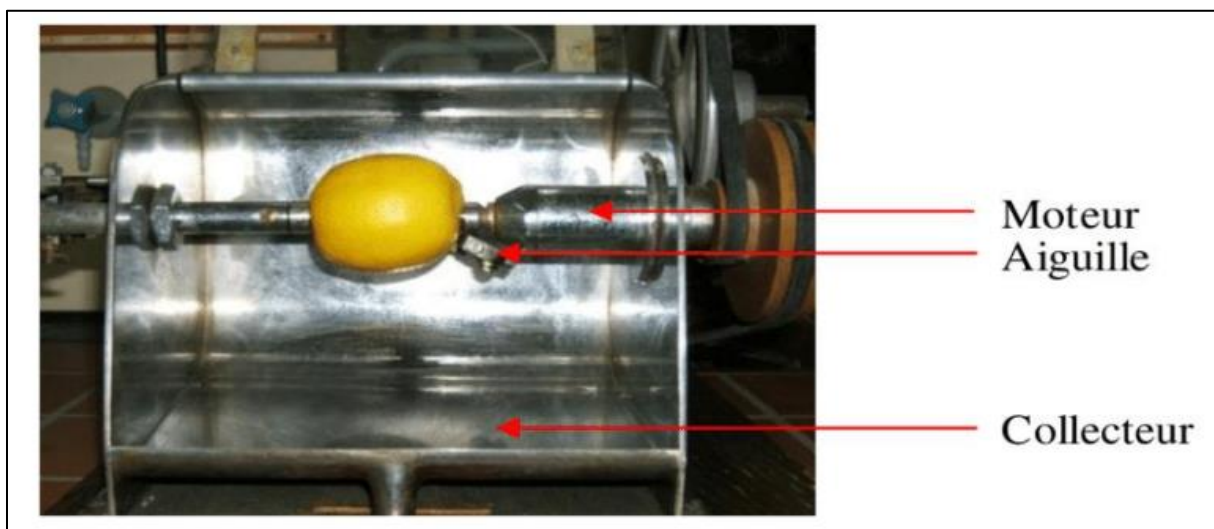
## 2.2.Extraction par solvants

Certains organes végétaux sont fragiles et ne peuvent pas supporter les traitements par entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation comme le cas des fleurs (par exemple fleurs de jasmin et d'œillet) d'où le recours à d'autres techniques d'extraction telle que l'extraction par des solvants. C'est une méthode d'extraction impliquant des solvants chimiques afin de dissoudre les huiles essentielles des plantes. Dans ce processus, plusieurs solvants ont été utilisés tels que le benzène (dans le cas de produits utilisés en parfumerie), l'hexane (pour l'ensemble des produits floraux frais) qui est le meilleur solvant grâce à sa forte solubilité dans l'huile, les alcools comme l'éthanol et le méthanol (extraction de vanille et cacao). Le principe de cette opération se base sur le broyage des plantes qui vont être mélangées avec le solvant qui va dissoudre les HEs. La solution obtenue est ensuite filtrée afin d'éliminer les impuretés. Puis, le solvant est évaporé en laissant derrière lui les HEs. L'extraction par solvants est adoptée pour les plantes contenant des quantités moyennes voir faibles d'HEs. Le Soxhlet, l'une des anciennes méthodes d'extraction par solvant, est défini par la recirculation du solvant dans l'échantillon jusqu'à ce que l'huile soit complètement éliminée (**Luque de Castro & Priego-Capote, 2010**). Dans cette procédure, les solutés obtenus sont sous forme très diluée d'où la nécessité d'un grand volume qui doit être concentré avant l'analyse. Ainsi, le temps d'extraction est de 1 et 72 heures et les solvants organiques utilisés, toxiques et coûteux, doivent être d'une grande pureté (**Yousefi et al., 2019**). De ce fait, certaines alternatives, telles que l'application d'ultrasons ou de micro-ondes, sont préférées (**Luque de Castro & Priego-Capote, 2010**) pour

réduire la consommation de solvants et la dégradation thermique des molécules cibles (**Palma et al., 2013**).

### 2.3.Extraction à froid ou pression mécanique

L'extraction à froid, appelée aussi pressage à froid, est une technique adaptée pour les plantes qui contiennent des quantités importantes d'HEs dans leurs écorces comme c'est le cas des agrumes (orange, pamplemousse et citron) (**Stratakos & Koidis, 2016**). Son principe de fonctionnement consiste à presser les écorces d'agrumes qui vont être lacérées par des aiguilles ce qui va créer des zones de compression dans la peau incitant l'HE à sortir vers l'extérieur pour être recueillie par un collecteur (**Figure 27**). Ensuite, l'HE est séparée par centrifugation, séchée par du sulfate de sodium anhydre et conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'analyse.

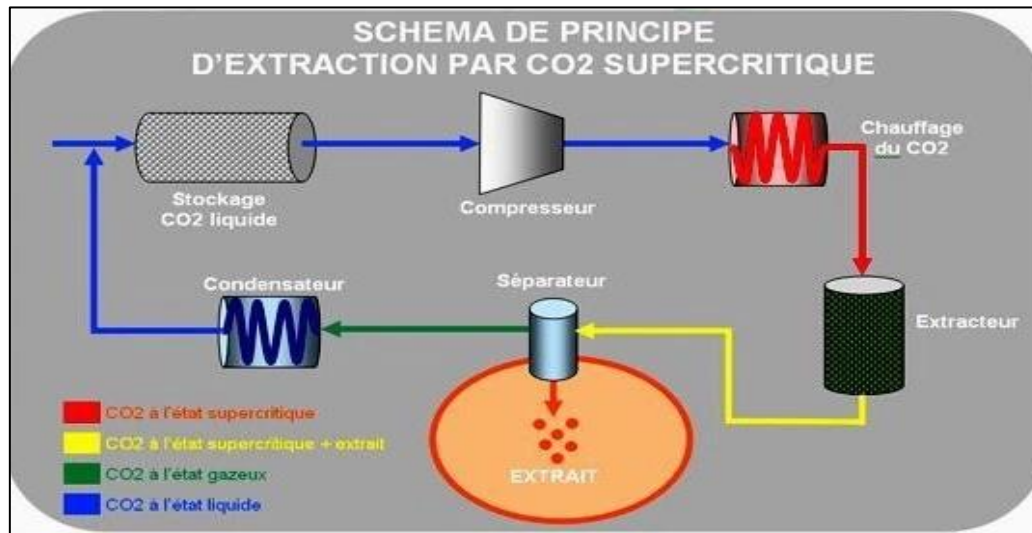


**Figure 27:** Montage de l'extraction à froid

### 2.4.Extraction par le CO<sub>2</sub>

L'extraction des HEs par le dioxyde de carbone est un processus d'extraction qui utilise des gaz supercritiques afin d'extraire des composés volatils à partir des plantes. L'originalité de cette technique repose sur la haute qualité des HEs associée à une courte durée d'extraction car elle ne nécessite pas l'utilisation de solvants chimiques et ne laisse pas de résidus dans les HEs. Cette méthode est considérée comme étant la plus efficace et la plus respectueuse de l'environnement comparativement à d'autres méthodes d'extraction. En effet, le CO<sub>2</sub> supercritique est un fluide aux propriétés liquides et gazeuses à la fois, ce qui lui confère une excellente capacité d'extraction avec une pression et une température spécifique en pénétrant

dans les cellules végétales pour extraire les composés aromatiques sans endommager la plante et sans laisser des résidus dans la phase d'élimination (**Figure 28**). L'avantage de cette opération c'est qu'elle combine les caractéristiques du gaz et du liquide lors du processus de l'extraction en réduisant les phénomènes de dégradation comme la séparation ou l'oxydation et minimisant ainsi le temps d'extraction (**Zermane et al., 2016**).



**Figure 28:** Principe d'extraction des HEs par le CO<sub>2</sub> supercritique

### 2.5.Enfleurage

C'est une méthode d'extraction traditionnelle adaptée pour les plantes caractérisées par des faibles teneurs d'HEs, en particulier les fleurs telles que le jasmin, le narcisse, la rose et la tubéreuse. Il existe deux types d'enfleurage : l'enfleurage à froid, qui est le plus fréquent, et l'enfleurage à chaud. Cette technique consiste à placer des pétales de fleurs fraîches à température ambiante sur une couche de graisse ou de cire appelée « châssis » (**Figure 29**). Cette méthode implique plusieurs répétitions avec des changements réguliers des pétales jusqu'à ce que la graisse ou la cire soit saturée en extrayant suffisamment d'huile essentielle. Bien que cette opération soit coûteuse et longue (plusieurs répétitions en plusieurs semaines), l'enfleurage reste appréciée, en particulier dans le domaine de parfumerie, pour certaines huiles essentielles de haute qualité principalement l'HE de jasmin (**Stratakos & Koidis, 2016**).

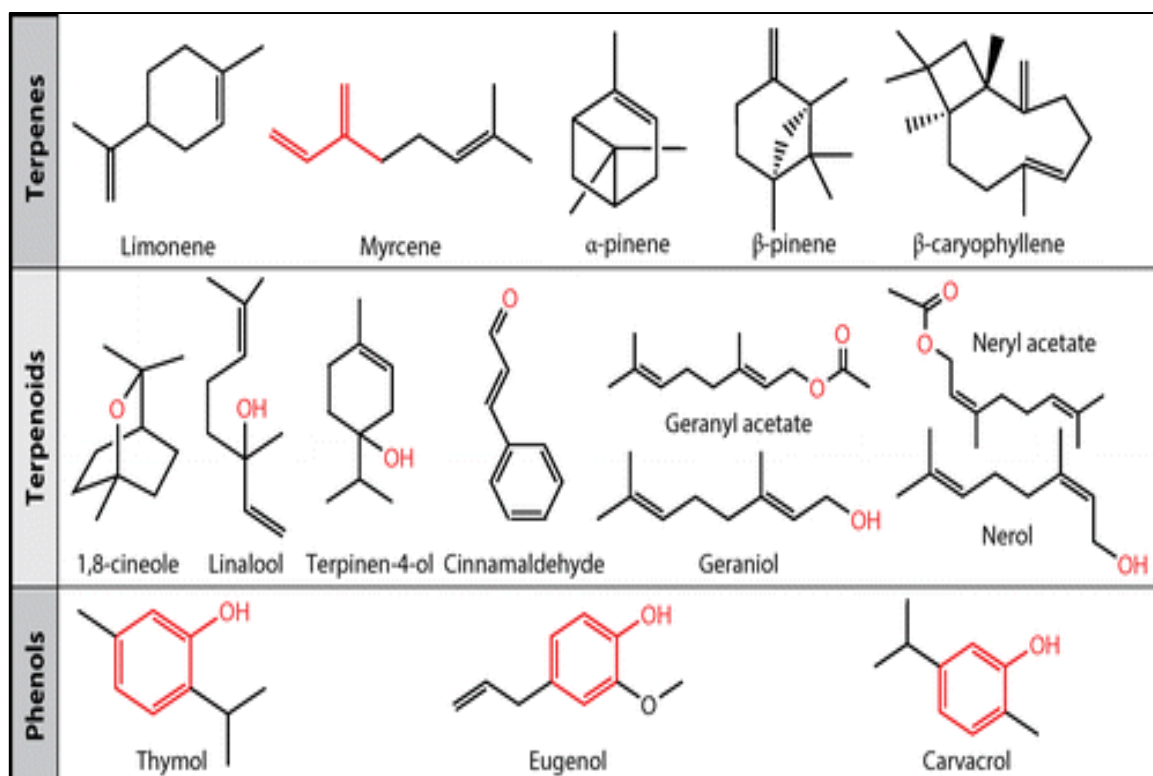


**Figure 29:** Schéma de l'enfleurage à froid

### 3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles, qui sont des substances produites à partir des plantes aromatiques, se caractérisent par une composition chimique souvent complexe est très variée mais analysable et qui peut varier en fonction des facteurs intrinsèques et extrinsèques, qui leur confère leurs propriétés thérapeutiques, tels l'origine géographique, l'organe producteur, le mode de culture, le mode de recueil et même le mode d'extraction (**Jugreet et al., 2020**). Les huiles essentielles contiennent un ou deux composés majoritaires responsables à leurs activités spécifiques. Ces constituants appartiennent à des groupes fondamentaux caractérisés par des origines biogénétiques distincts (**Figure 30**) : le groupe des terpènes et des terpénoïdes (ou composés terpéniques ou terpènes oxygénés), les phénols (composés aromatiques dérivés du phénylpropane) beaucoup moins fréquents et d'autres composés d'origines diverses (**Rao et al., 2019**).



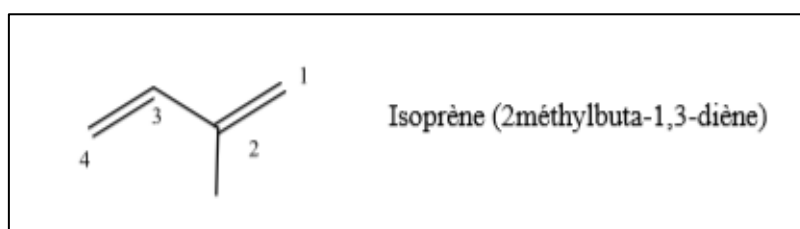


**Figure 30:** Structure chimique des principaux groupes des huiles essentielles

(Rao et al., 2019)

### 3.1. Composés terpéniques (terpènes et terpénoïdes)

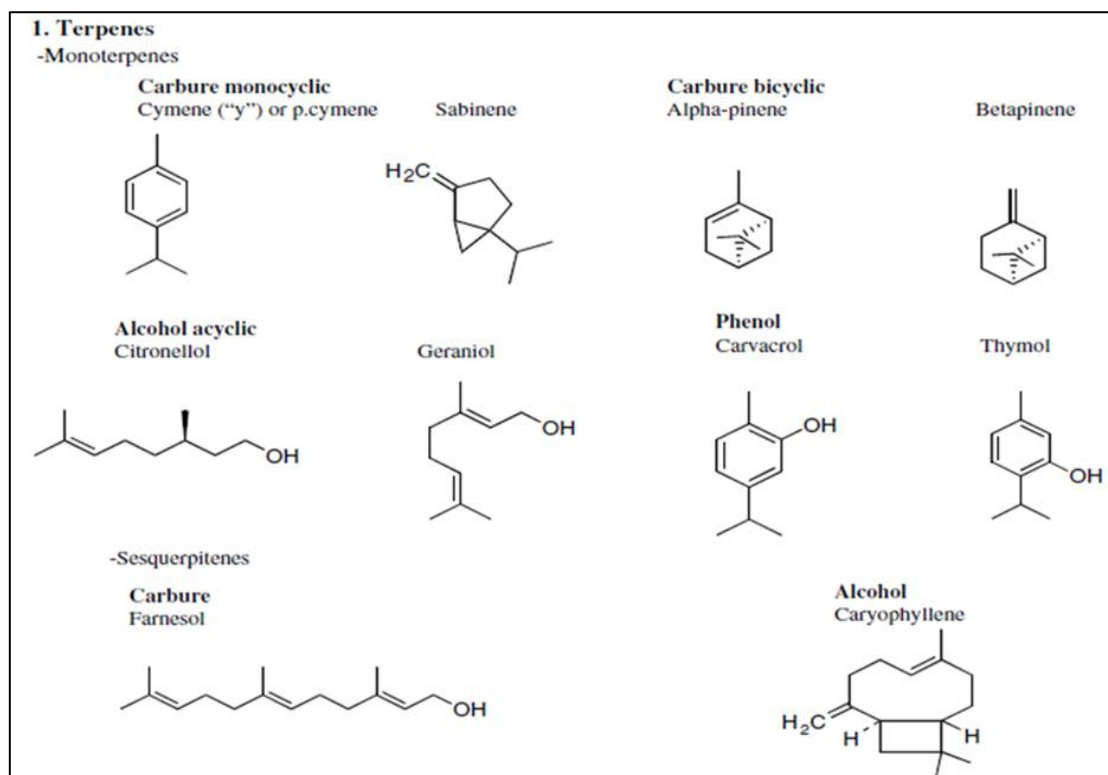
Les terpènes sont les principaux constituants des HEs. Ce sont des hydrocarbures formés par l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques à base de 5 carbones dont la structure est arrangée de façon linéaire ou cyclique (Rao et al., 2019). Ce sont des polymères isoprène de formule brute  $(C_5H_8)_n$  (Figure 31).



**Figure 31:** Structure chimique d'un isoprène

Sur la base de nombre d'unités isopréniques associées à la molécule, on distingue les monoterpènes en  $C_{10}$ , les sesquiterpènes en  $C_{15}$ , les diterpènes en  $C_{20}$ , les triterpènes en  $C_{30}$ , les tétraterpènes en  $C_{40}$ , et les polyterpènes. Les huiles essentielles contiennent particulièrement

des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu de diterpènes (Tongnuanchan & Benjakul, 2014). En effet, Ces terpènes ont des structures très variées (acycliques, monocycliques, bicycliques) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques (Figure 32).



**Figure 32:** Structure chimique de quelques composés terpéniques des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

### a. Les monoterpènes

Les monoterpènes, constituant 90% des HEs et dont la formule brute est de  $C_{10}H_{16}$ , sont obtenus à partir de l'association de deux unités isopréniques. Ces molécules peuvent être acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -terpinène, p-cymène) ou des monoterpènes bicycliques (pinènes,  $\delta$ -3-carène, camphène, sabinène) (Figure 32). Les composés monoterpéniques sont synthétisés par une enzyme appelée monoterpène synthase en utilisant le géranyl-pyrophosphate (GPP) comme substrat (Oldfield & Lin, 2012; Schmidt-Dannert, 2014).

### b. Les sesquiterpènes

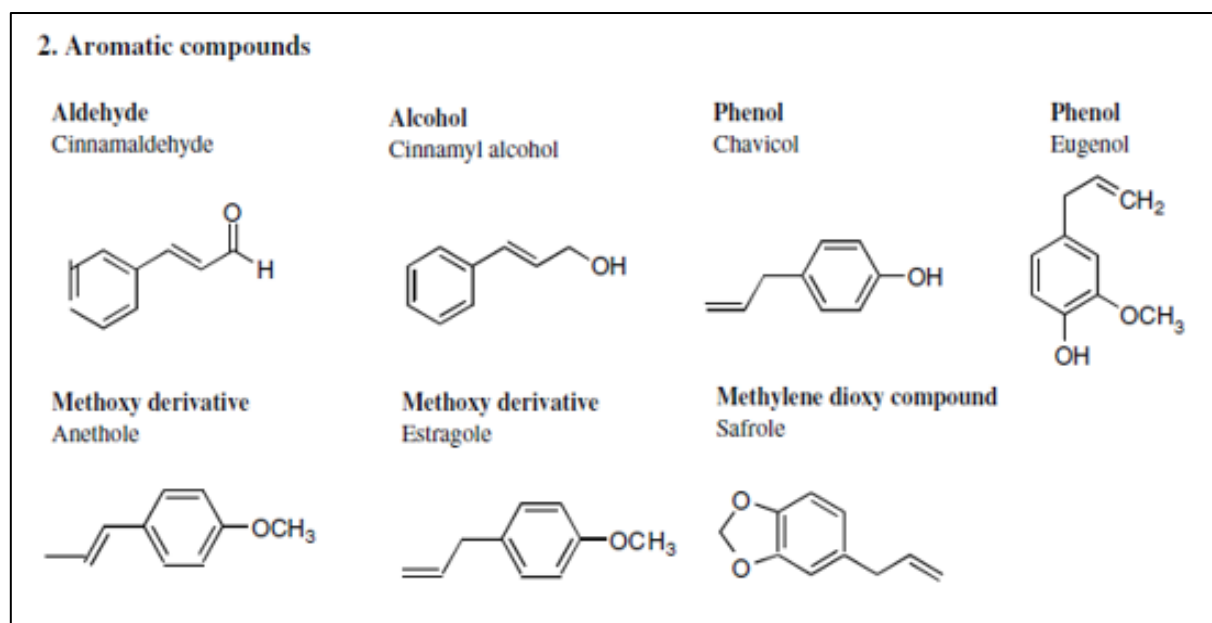
Les sesquiterpènes est une autre classe des composés terpéniques issue de l'assemblage de trois unités isopréniques, soit la formule brute  $C_{15}H_{24}$ . Ils peuvent être également, comme

les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène,  $\alpha$ -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine,  $\beta$ -artémisinine) et ils renferment aussi des fonctions comme alcools, cétones, aldéhydes, esters (**Bakkali et al., 2008**). Cependant, ces composés sont présents en faibles proportions dans les HEs dont le  $\beta$ -caryophyllène qui est un sesquiterpène bicyclique naturel présentant le constituant majeur de plusieurs HEs (**Rao et al., 2019**).

Contrairement aux terpènes, les unités isoprènes des terpénoïdes sont associées ou modifiées de nombreuses façons comme l'addition d'atomes d'oxygène à l'unité isopréniques, ou l'élimination ou l'ajout de groupes méthyles. De plus, en fonction du nombre d'unités présentes, les terpénoïdes peuvent être divisés en monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes ou en diterpénoïdes. Ils peuvent également être classés en fonction du nombre et des structures cycliques qu'ils contiennent (**Schmidt-Dannert, 2014**).

### 3.2. Composés aromatiques dérivés de phénylpropane (Phénols)

Les composés aromatiques ou phénylpropanoïdes sont des dérivés de phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) et sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones. Les phénols ou les phénols terpénoïdes est un groupe de composés chimiques où un groupe hydroxyle (-OH) est lié directement à un cycle aromatique (C<sub>6</sub>). La production de ces composés est moins abondante dans les HE que les terpènes (**Calsamiglia et al., 2007**). Cette classe comprend des alcools comme l'alcool cinnamique, des phénols comme le chavicol et l'eugénol, des aldéhydes comme l'aldéhyde cinnamique ou également des dérivés méthoxy tels que l'anéthol, l'élémicine et l'estragol (**Figure 33**). Les composés aromatiques sont présents principalement dans les huiles essentielles du thym, de l'origan, de la cannelle, de la muscade, du persil et du fenouil (**Bakkali et al., 2008; Rao et al., 2019**).



**Figure 33: Structure chimique de quelques composés aromatiques des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)**

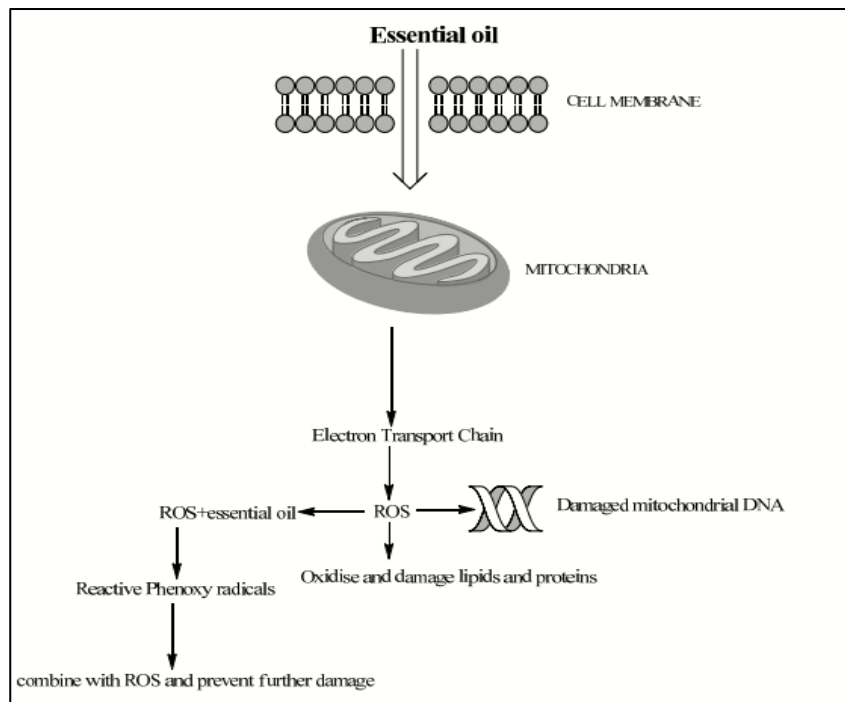
### 3.3. Autres composés d'origines diverses

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions entraînables lors de l'hydrodistillation. Ces composés sont issus de la transformation de molécules non volatiles. Ils sont généralement de faible poids moléculaire.

## 4. Activités biologiques

### 4.1. Activités antioxydantes

Diverses études ont montré que les HEs sont de puissants antioxydants. Par exemple, les HEs de jasmin, thym, curcuma, lavande, feuille de cannelle, basilic possèdent des potentiels antioxydants considérables (Bhalla et al., 2013; Ayaz et al., 2017). Les HEs ont plusieurs modes d'action en tant qu'antioxydant, tel que la combinaison avec les radicaux libres générés par la membrane mitochondriale endommagée afin de fournir des radicaux phénoxy réactifs qui se combinent davantage avec les ERO et préviennent d'autres dommages (Bhalla et al., 2013) (Figure 34).



**Figure 34: Mécanisme antioxydant des HEs (Bhalla et al., 2013)**

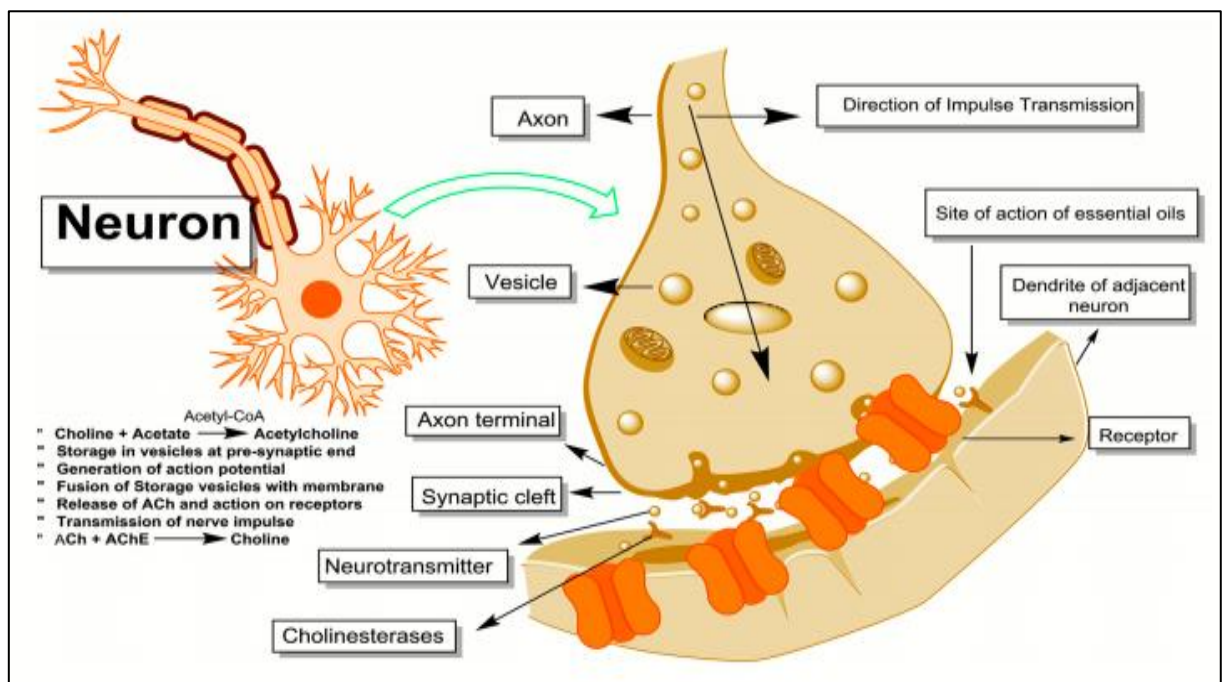
Les HEs de basilic, cannelle, clou de girofle, muscade, origan et de thym, sont connues comme sources naturelles de composés phénoliques capables de piéger les radicaux libres (Tomaino et al., 2005). Le thymol et le carvacrol sont les principaux composés actifs responsables de l'activité antioxydante des HEs (Braga et al., 2006; Tanu & Harpreet, 2016). Leurs activités sont en relation avec leurs structures phénoliques car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres.

Les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures et les éthers présentent également une activité de piégeage des radicaux libres pour certaines HEs y compris les HEs de thym de *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* et *Thymus mastichina*. Leurs activités antioxydantes sont dues à la présence de certains composés possédant cette propriété tels que le linalol et le 1,8-cinéole (Tanu & Harpreet, 2016).

#### 4.2. Activités neuroprotectrices

Il a été signalé que les HEs seraient un remède très efficace en raison de leurs potentiels neuroprotecteurs et anti-âge et de leur implication dans divers troubles induits par les radicaux libres, y compris les maladies neurologiques et le vieillissement (Ayaz et al., 2017). Des études ont révélé que les HEs possèdent un potentiel d'inhibition de la

cholinestérase et sont pertinents dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes des HEs sont associés à l'hypothèse du stress oxydant et à l'hypothèse cholinergique, dans cette dernière, la perte de neurotransmission cholinergique par les enzymes qui catalysent l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine (ACh) et la destruction des neurones cholinergiques dans le cerveau antérieur basal perturbent la fonction cognitive (Savelev et al., 2004; Benny & Thomas, 2019). Les HEs présentent à la fois des potentiels inhibiteurs d'acétylcholinestérase (AChE) et de butyrylcholinestérase (BChE) impliquées dans la dégradation de l'ACh. Ces inhibiteurs se lient de manière réversible aux sites actifs des enzymes AChE / BChE empêchant la dégradation hydrolytique de l'ACh et maintiennent sa concentration synaptique ce qui entraîne un soulagement des symptômes de la maladie d'Alzheimer (Ayaz et al., 2017) (Figure 35).



**Figure 35:** Synthèse neuronale et clivage enzymatique de l'acétylcholine (ACh) par l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les HEs peuvent inhiber l'action de ces deux cholinestérases (Ayaz et al., 2017)

Il a déjà été montré que les constituants volatils des huiles essentielles, en raison de leur petite taille moléculaire et de leur lipophilie, sont susceptibles de traverser facilement la barrière hémato-encéphalique (Savelev et al., 2004; Benny & Thomas, 2019).

D'autres études ont révélé que l'activité antioxydante et neuroprotectrice des HEs sont principalement liées aux principaux composés actifs présents dans les HEs (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

#### 4.3. Activités antimicrobiennes

De nombreuses HEs sont réputées comme de puissants antibactériens. Leur spectre d'action est très étendu puisqu'elles agissent contre un large éventail de bactéries y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. En effet, les bactéries à gram positif seraient plus résistantes aux HEs grâce à la présence d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides rendant la bactérie hydrophile ce qui empêche les terpènes d'y adhérer (Burt, 2004). En général, les HEs augmentent la perméabilité de la paroi cellulaire des bactéries entraînant la perte de leurs constituants, le blocage de la production de l'énergie et la synthèse des composants de structure par acidification de l'intérieur de la bactérie (Jugreet et al., 2020). Le thymol présent dans l'HE de thym a montré un potentiel antibactérien vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par la perturbation de la fraction lipidique conduisant à une fuite du matériel intracellulaire (Trombetta et al., 2005; Sienkiewicz et al., 2012).

En outre, certaines HEs sont dotées d'une activité antifongique. En effet, il a été démontré que les HEs riches en phénylpropanoïdes (eugénol) et les alcools sesquiterpéniques monocycliques ( $\alpha$ -bisabolol) présentent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance des dermatophytes et le développement des spores (Raut & Karuppayil, 2014). Les HEs riches en terpénoïdes présentent une activité inhibitrice contre les champignons pathogènes des humains résistants aux médicaments notamment le *Candida albicans*. L'action des terpénoïdes serait contre le biofilm par l'inhibition de l'ergostérol membranaire et les voies de signalisation intervenant dans la formation des filaments hyphes (Raut & Karuppayil, 2014).

#### 4.4. Activités anti-inflammatoires

L'inflammation est une réponse normale protectrice induite par l'organisme lors d'une lésion ou d'une infection pour éliminer les cellules endommagées ou mortes. Au cours de ce processus, il y a activation en cascade des enzymes, des molécules d'adhésion, des cytokines pro-inflammatoires. En plus de leurs propriétés antioxydantes, neuroprotectrices et antimicrobiennes, les HEs possèdent également une activité anti-inflammatoire en inhibant les médiateurs pro-inflammatoires. Leurs interactions sont associées avec des

cascades de signalisation impliquant des cytokines et des facteurs de transcription et l'expression des gènes pro-inflammatoires (**Miguel, 2010**).

Par exemple, l'HE de Lavande a la capacité d'inhiber l'inflammation par inhibition du TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) et NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) dans le cerveau murin (**Hajhashemi et al., 2003; Kar et al., 2018b**).

L'HE de Camomille est utilisée depuis des siècles comme un anti-inflammatoire et aussi pour soulager les symptômes associés à eczéma, dermatite et autre irritation (**Miguel, 2010**).

Il a été démontré que, l'application cutanée de plusieurs HEs, en particulier de Géranium, chez des souris supprimait les symptômes inflammatoires associée à l'accumulation de neutrophiles et à l'œdème (**Jugreet et al., 2020**).



## OBJECTIFS DE LA THESE

Avec l'augmentation de la durée de vie, le vieillissement est un sujet de préoccupation majeure. Ce processus physiologique conduit à un ensemble de modifications progressives qui favorisent le stress oxydant et des dysfonctions des organites (mitochondries, peroxysomes). Ceci favorise la survenue de maladies liées à l'âge telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson), oculaires (DMLA, glaucome), osseuse (ostéoporose), et musculaire (sarcopénie) Le vieillissement cutané est la marque la plus visible de l'âge. Il devient donc primordial de mieux connaître les molécules impliquées dans le vieillissement et aussi développer des stratégies nutraceutiques et thérapeutiques pour prévenir et traiter ces maladies liées à l'âge qui sont une charge financière et sociétale.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux polyphénols, aux oxystérols et aux huiles essentielles (HEs).

Les polyphénols sont des nutriments associés au régime méditerranéen. Ces molécules et en particulier le trans-resvératrol (RSV) ont des effets anti-vieillessement. Cependant, le RSV est rapidement métabolisé *in vivo* ce qui rend son utilisation thérapeutique difficile. Pour pallier ce problème, on peut envisager d'utiliser des molécules de synthèse issues du RSV, comme les aza-stilbènes (AZA-STs).

Par ailleurs, parmi les divers facteurs associés aux maladies liées à l'âge et pouvant les induire et/ou aggraver, on trouve le stress oxydant, l'inflammation et la mort cellulaire. Plusieurs études cliniques, *in vitro* et sur des modèles animaux sont en faveur d'une implication de molécules issues de l'oxydation du cholestérol (oxystérols) dans le développement des maladies liées à l'âge. Parmi ces molécules figurent le 7-cétocholestérol (7KC) et le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol (7 $\beta$ -OHC).

Pour s'opposer au vieillissement, en particulier cutané, des huiles essentielles (HEs) se sont montrées bénéfiques. Les bienfaits des HEs sont bien connus en médecine traditionnelle et en aromathérapie. Plusieurs composants des HEs pourraient ainsi avoir un effet anti-vieillessement

Dans le travail de Thèse réalisé dans le cadre des maladies liées à l'âge, de leurs physiopathologies et de leurs préventions, nous nous sommes intéressés aux aza-stilbènes (AZA-ST) et trans-resvératrol (RSV), aux oxystérols (7KC et 7 $\beta$ -OHC), et aux HEs.

Trois axes complémentaires ont ainsi été traités :

✓ Le premier axe a consisté à synthétiser des AZA-STs et à les comparer par rapport au RSV sur des cellules neuronales murines N2a. Les activités cytotoxiques des AZA-STs (dysfonctions mitochondriales, stress oxydant, induction de mort cellulaire et incidence sur le cycle cellulaire) ont été étudiées comparativement au RSV. Cet axe s'inscrit dans les activités anti-tumorales du RSV et des AZA-STs.

✓ Le deuxième axe a consisté à mieux caractériser la mort cellulaire induite par le 7KC et 7 $\beta$ -OHC sur cellules N2a pour un temps de traitement important (72h). La mort par oxyapoptophagie (« oxiapoptophagy ») a été caractérisée et les effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade ont été comparé à ceux de l'alpha-tocophérol (molécule cytoprotectrice de référence). Le profil de l'huile de pépins de grenade (lipides, polyphénols) ainsi que son pouvoir antioxydant (test KRL) ont été déterminés.

✓ Le troisième axe a consisté à étudier les activités d'HEs de jasmin et de thym (HEs méditerranéennes) sur des kératinocytes humains établis en lignée, les cellules HaCaT. Sur ces cellules, les effets de ces HEs ont été abordés en prenant en compte, la viabilité et la prolifération (analyse du cycle cellulaire), le stress oxydant, et l'impact sur la mitochondrie. Les HEs ont aussi été caractérisées chimiquement et leur pouvoir antioxydant a été étudié (test KRL) ainsi que leurs effets sur le métabolisme du cholestérol.

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## 1. Préparation des molécules

### 1.1. Oxystérols

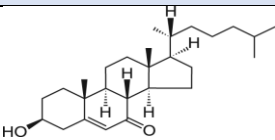
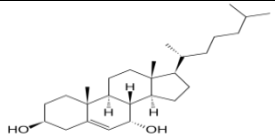
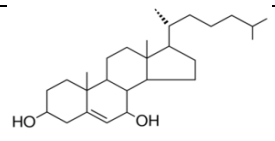
Les oxystérols étudiés, 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol (7 $\alpha$ -OHC) et 7 $\beta$ -hydroxycholestérol (7 $\beta$ -OHC) ont été synthétisés par l'équipe du Professeur Mohammad SAMMADI (Metz, France). Le 7-cétocholestérol (7KC) provient de chez Sigma-Aldrich (ref: C2394; pureté >98%).

Les différents oxystérols ont tous été préparés de la même manière : une masse d'oxystérols est pesée et dissoute dans l'éthanol absolu (98%) à raison de 1 mg pour 50  $\mu$ L d'éthanol absolu. Ensuite, la solution éthénolique d'oxystérol (50  $\mu$ L) est diluée dans 1,2 mL de milieu de culture DMEM supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Pan Biotech) et 1 % d'antibiotiques afin d'obtenir une solution mère d'oxystérol à 2 mM (800  $\mu$ g/mL).

Le contrôle de la qualité de ces molécules est réalisé avec les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  obtenus avec un spectromètre Bruker Avance 400 ; la pureté était de 98-99% voir supérieure.

Ces oxystérols étudiés sont représentés dans le **Tableau 1**

**Tableau 1:** Représentation des oxystérols oxydés en C7

Oxystérol	Formules chimiques	Structure	Masse molaire (g/mol)
7-cétocholestérol	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2$		400,637
7 $\alpha$ -hydroxycholestérol	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$		402,653
7 $\beta$ -hydroxycholestérol	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$		402,700

## 1.2. Resvératrol

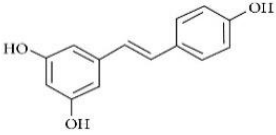
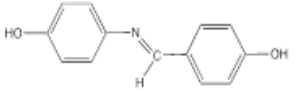
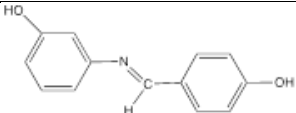
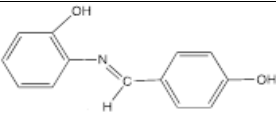
Le trans-resvératrol (RSV), qui est un polyphénol naturel de la classe des stilbènes, est la molécule de référence pour l'étude avec les AZA-STs. Il provient de chez Sigma Aldrich (Réf : 501-36-0 ; pureté 99%) ; celui-ci a été dissout dans l'éthanol absolu (EtOH; Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) pour avoir une solution mère à 50 mM.

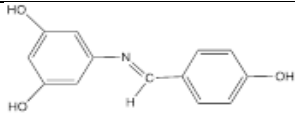
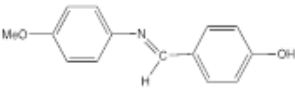
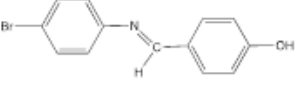
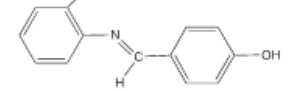
## 1.3. Aza-stilbènes

Les aza-stilbènes (AZA-STs) sont des polyphénols synthétiques issus du trans-resvératrol (RSV). Ils ont été fournis par l'équipe du Professeure Dominique Vervandier-Fasseur (Université de Bourgogne, Dijon, France). Les AZA-STs ont tous préparés de la même manière en les dissolvant dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) et une solution mère a été préparée à 50 mM. La caractérisation des sept aza-stilbènes a été effectuée par la Professeure Dominique Vervandier-Fasseur avec les RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) obtenus avec un spectromètre Bruker Avance 400 (diamond ATR, Kontich, Belgique).

Les différentes molécules traitées sont présentées dans le **Tableau 2**

**Tableau 2:** Principales caractéristiques chimiques du trans-resvératrol et des Aza-stilbènes

	Formules chimiques	Structure	Masse molaire (g/mol)	Solubilité (Temp. Ambiante)
<b>Resvératrol</b>	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$		228,250	-Ethanol absolu
<b>AZA-Stilbènes</b>				
AZA-ST 1a (AZA-ST I)	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$		213,228	-DMSO -Ethanol absolu
AZA-ST 1b (AZA-ST II)	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$		213,228	-DMSO
AZA-ST 1c (AZA-ST III)	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2$		213,228	-DMSO

AZA-ST 1d (AZA-ST IV)	$C_{13}H_{11}NO_3$		229,228	-DMSO -Ethanol absolu
AZA-ST 1e (AZA-ST V)	$C_{14}H_{13}NO_2$		227,254	-DMSO
AZA-ST 1f (AZA-ST VI)	$C_{13}H_{10}NOBr$		276,11	-DMSO
AZA-ST 1g (AZA-ST VII)	$C_{13}H_{10}NOBr$		276,11	-DMSO -Ethanol absolu

#### 1.4. $\alpha$ -tocophérol

L' $\alpha$ -tocophérol est le constituant majeur de la vitamine E. L' $\alpha$ -tocophérol (Sigma-Aldrich, Réf: T3251; pureté >96%) ; c'est la molécule cytoprotectrice de référence pour les oxystérols; l' $\alpha$ -tocophérol est préparé en dissolvant 0,34 g dans 1 mL d'éthanol absolu (EtOH 100 %) ; une solution mère a été obtenue à une concentration de 80 mM ; cette solution est conservée à -20°C.

#### 1.5. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) de Jasmin (*Jasmonium grandiflorum*) et de Thym (*Thymus vulgaris*), ont été achetées chez Onatera (France : <https://www.onatera.com> ; consulté le 08 Janvier 2023), et ont été utilisées dans ce travail.

Les cellules HaCaT ont été traitées par ces deux huiles en utilisant une solution mère de concentration de 80 mg / mL diluées dans DMSO (92  $\mu$ L d'HE dans 1 mL de DMSO). Les deux huiles essentielles de Thym (100  $\mu$ g / mL) et de jasmin (200  $\mu$ g / mL) ont été utilisées à ces concentrations sur cellules HaCaT (traitement 24 h).

## 2. Culture et traitement des cellules

### 2.1. Matériel biologique : lignées de neuroblastome de souris (N2a) et de kératinocytes humains (HaCaT)

- **Cellules de neuroblastome murin N2a** : La lignée cellulaire de neuroblastome de souris neuro-2a (N2a) (ATCC<sup>®</sup> CLL-131<sup>™</sup>) est utilisée pour étudier les mécanismes fondamentaux de la fonction cérébrale et les mécanismes de neurodégénérescence associés à certaines maladies liées à l'âge telles que les maladies d'Alzheimer et de

Parkinson. Ces cellules N2a correspondent au modèle expérimental utilisé dans ce travail de Thèse.

- **Kératinocytes humains HaCaT** : La lignée cellulaire HaCaT est une lignée de cellules épidermiques (la couche la plus superficielle de la peau) humaines immortalisées. Ces kératinocytes ont été obtenues pour la première fois à partir d'une biopsie de peau humaine saine et ont été immortalisées en utilisant un virus oncogène. Ces cellules ont été utilisées.

## 2.2. Culture cellulaire

La lignée de neuroblastomes de souris neuro-2a (N2a) (ATCC ® CCL-131™) est cultivée dans un milieu de culture composé d'un mélange de *Dulbecco's modified Eagle medium* DMEM (Lonza, Bale, Suisse) supplémenté par 10% de Sérum du veau foetal (SVF) décomplémenté (chauffé 30 minutes à 56°C) (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) et par 1% de pénicilline/streptomycine (100 U/mL pénicilline, 100 mg/mL streptomycine) (Pan Biotech GmbH). Ces cellules sontensemencées à une densité de 60 000 cellules par puits en plaque 24 puits, 120 000 cellules par puits en plaque 12 puits dans un volume de 1 mL de milieu de culture par puits.

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri, incubées en atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> et trypsinées à raison de deux fois par semaine (0.05% trypsine - 0.02% EDTA) (Pan Biotech GmbH). A confluence (environ 80 %), le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) dans le but d'enlever toute trace d'inhibiteurs de trypsine présente dans le sérum. Les boîtes sont placées à 37°C pendant 2-3 min après l'ajout de la Trypsine (2 mL par boîte) afin de détacher les cellules qui seront dispersées dans du milieu de culture complet. Une partie de la suspension cellulaire seraensemencée dans des plaques pour le traitement, et l'autre partie sera réensemencée dans de nouvelles boîtes de Pétri pour les prochains passages.

## 3. Evaluation de la viabilité et de l'adhérence cellulaire

### 3.1. Mesure de l'activité estérase : test FDA (Fluorescéine Diacétate)

La viabilité cellulaire a été quantifiée grâce à l'activité estérase détectée par la fluorescéine diacétate (FDA) (Namsi et al., 2019). À la fin de la période de traitement, les cellules ont été incubées à l'obscurité (37°C) pendant 8 min avec 15 µg/mL de FDA (Sigma-Aldrich), qui reste séquestré dans le compartiment cytosolique et qui fluoresce en vert dans les cellules vivantes. Après incubation, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS (0,1 M, pH 7,4) puis lysées

avec un tampon Tris/HCl contenant 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'intensité de la fluorescence a été mesurée ( $\lambda$  Excitation = 485 nm ;  $\lambda$  Emission = 528 nm) avec un lecteur de plaque (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France) afin de quantifier les cellules vivantes.

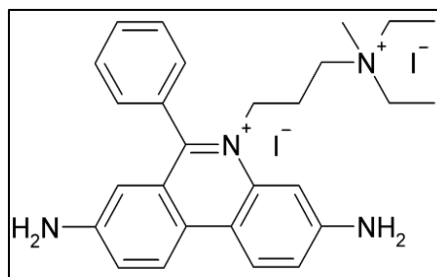
### 3.2. Evaluation de l'adhérence cellulaire : test Sulforhodamine 101 (SR101)

La mort cellulaire étant associée à une perte d'adhérence cellulaire, le test Sulforhodamine 101 (SR101) permet la quantification des cellules adhérentes, considérées comme des cellules viables. La SR101 est un colorant anionique qui se lie aux protéines cellulaires (**Yamine, Zarrouk, et al., 2020**). A la fin du traitement, les cellules N2a ont été fixées avec de l'éthanol à 70% pendant 20 minutes (4°C), puis incubées pendant 30 minutes (4°C) avec du SR101 (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) et rincées deux fois avec du PBS. L'intensité de fluorescence a été mesurée avec une excitation à 535 nm et une émission à 610 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence TECAN (spectrophotomètre Sunrise, TECAN, Lyon, France).

### 3.3. Evaluation de la confluence cellulaire : coloration au Crystal Violet

Le Crystal Violet, permettant d'évaluer la confluence, colore les noyaux des cellules vivantes qui sont adhérentes d'une couleur violet foncé. Après culture et traitement des cellules N2a, les surnageants contenant les cellules mortes sont éliminés et les plaques de cultures ont été rincées 2 fois avec du PBS, ensuite 500  $\mu\text{L}$  de la solution de Crystal Violet (Sigma Aldrich) a été ajoutée dans chaque puits pendant 5 minutes à température ambiante. Trois lavages avec de l'eau distillée ont été effectués afin d'éliminer l'excès du colorant. Les cellules sont alors séchées et incubées avec une solution de dissolution (citrate de sodium 0.1 M, éthanol 50%) du Crystal Violet (10 min, température ambiante). Le Crystal Violet présent dans les cellules est ainsi dissout et l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques pour quantifier la confluence.

### 3.4. Mesure par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium



**Figure 36:** Structure chimique de l'Iodure de Propidium



L'iodure de propidium (IP) est un colorant fluorescent utilisé pour la quantification de la mortalité cellulaire (**Figure 36**). Il s'agit d'une molécule cationique rouge hydrophile qui ne pénètre que dans les cellules ayant perdues l'intégrité de leurs membranes plasmiques (membranes plasmiques perméabilisées), ce qui indique qu'elles sont mortes. L'IP (Sigma Aldrich) est un fluorochrome qui s'intercale irréversiblement au niveau des acides nucléiques (ADN, ARN) en produisant une fluorescence rouge / orange ( $\lambda_{\text{Ex max}} = 538 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{Em max}} = 617 \text{ nm}$ ) quand il est excité avec un laser bleu (488 nm). La solution mère a été préparée à la concentration de 1 mg / mL dans l'eau MilliQ et stockée à l'abri de la lumière à +4°C.

Les cellules N2a sontensemencées de l'ordre de  $6 \times 10^4$  cellules par puits en plaque de 24 puits. Après 48 h de traitement par le resvératrol et les sept Aza-stilbènes (6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$ ), les cellules mortes et vivantes récupérées ont été centrifugées 5 min à 300 g. Puis, le culot cellulaire a été lavé avec 1 mL de PBS (1X), coloré avec une solution IP (1  $\mu\text{g}$  / mL de PBS) et incubé à 37°C. En prenant en compte 10 000 cellules par échantillon, les analyses ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux LSR II Digital (BD Biosciences) ; la fluorescence est collectée avec un filtre passe bande de  $590 \pm 20 \text{ nm}$  sur une échelle logarithmique et les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo. Le pourcentage des cellules mortes correspond aux cellules IP positives.

#### **4. Caractérisation et évaluation de la mort cellulaire**

##### **4.1. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase**

Après 24 h de traitement par les huiles essentielles (HEs) de Jasmin (200  $\mu\text{g}$  / mL) et de Thym (100  $\mu\text{g}$  / mL) en plaques 6 puits avec une densité cellulaire de l'ordre de  $5 \times 10^5$ , la morphologie des cellules HaCaT a été observée sous un microscope à contraste de phase (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Cinq images correspondent à cinq champs microscopiques ont été prises au centre de puits de culture avec les grossissements x4, x10 et x20 (objectif : LD plan-achromat, Réf : 415500-1614-000). Les images digitalisées ont été obtenues avec une caméra AxioCam Zeiss (5MP HD IP).

## **4.2. Caractérisation et quantification de l'apoptose par coloration au Hoechst 33342 et au May-Grünwald-Giemsa**

### **4.2.1. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 : application à l'apoptose**

Pour distinguer entre les cellules apoptotiques et les cellules qui ne sont en apoptose, des critères morphologiques nucléaires ont été utilisés. En effet, les cellules apoptotiques, de petite taille, présentent une condensation et une fragmentation de leurs noyaux tandis que les cellules saines auront un noyau circulaire et non condensé, avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé.

Les cellules mortes, non adhérentes, qui se trouvent dans le surnageant, sont récupérées ; les cellules adhérentes sont trypsinées et centrifugées, mélangées avec les non-adhérentes puis fixées avec du paraformaldéhyde filtré (PFA 4%) pendant 15 minutes à température ambiante. Après lavage en PBS 1X, les cellules sont incubées avec du Hoechst 33342 à 1 µg/mL pendant 5 minutes puis lavées PBS 1X et une cyto centrifugation est réalisée (cytospin 2 ; Shandon/Thermo Scientific) à 1500 tours/minute pendant 5 minutes afin de déposer environ 40 000 cellules sur une lame de microscope. Le montage lame / lamelle est effectué avec du « mounting fluorescent medium » (Dako) et l'observation est réalisée au microscope à fluorescence (Axioskop fluorescent, Zeiss). 300 noyaux sont comptés par lame pour déterminer le pourcentage de noyaux apoptotiques (quantification de l'apoptose par le pourcentage de cellules avec des noyaux condensés et/ou fragmentés).

### **4.2.2. Analyse de l'aspect des noyaux et du cytoplasme après coloration au May-Grünwald-Giemsa : Application à l'apoptose, la nécrose et l'autophagie**

Pour quantifier les cellules ayant des noyaux apoptotiques dont le cytoplasme contient des vacuoles pouvant correspondre à des vacuoles autophagiques, la coloration au May-Grünwald-Giemsa a été appliquée. Cette coloration repose sur l'action combinée de deux colorants neutres à l'état inactif permettant la visualisation de détails morphologiques : Le May-Grünwald qui contient un colorant acide (l'éosine) et un colorant basique (le bleu de méthylène) ; et le Giemsa qui comporte lui aussi de l'éosine et un colorant basique (l'azur de méthylène).

Après traitement, les cellules (environ 40 000 cellules) ont été déposées sur lames par cyto centrifugation (5 minutes / 1500 tours) et fixées avec du méthanol 100% pendant 5 minutes. Puis, les lames sont colorées par le May-Grünwald (pendant 5 minutes) et incubées avec le Giemsa par la suite à température ambiante pendant 15 minutes. Les préparations sont ensuite

lavées par l'eau distillée (2 x 15 secondes) pour éliminer tout excès de colorant, séchées à 37°C ou à température ambiante (30 minutes minimum) et immergées dans du Xylène pendant 30 secondes. Le montage est réalisé en EUKITT entre lame et lamelle et les échantillons sont stockés à +4°C jusqu'à l'observation. Dans ces conditions deux couleurs seront observées en lumière blanche : noyau coloré en rose et cytoplasme coloré en bleu violet.

#### **4.3. Evaluation de de l'apoptose par cytométrie en flux par mesure de l'activation des caspases 3/7**

L'évaluation de l'apoptose par cytométrie en flux est mesurée par activation des caspases 3/7 dans les cellules (Technique FLICA : FLuorescent Inhibitors of CASpases).

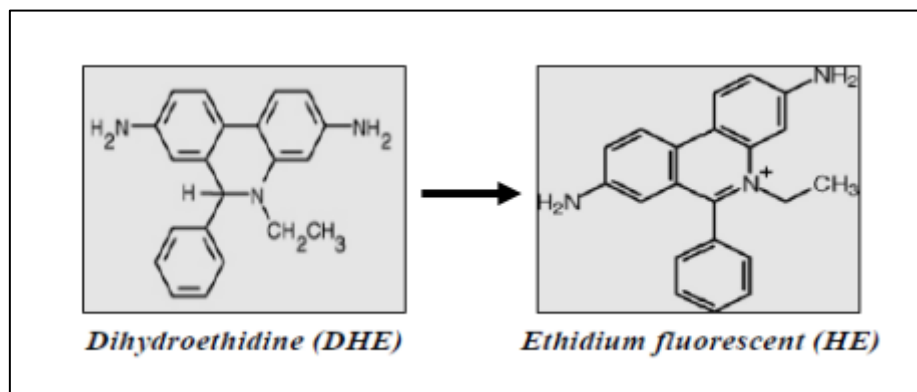
Les cellules N2a traitées par le 7KC (25 µM ; 50 µM), par le 7α-hydroxycholestérol (25 µM ; 50 µM) et par le 7β-hydroxychoestérol (12,5 µM ; 25 µM) ont été collectées par trypsination après 72 h de traitement par les oxystérols et centrifugées pendant 5 minutes à 300 g. Après lavage avec du PBS 1X, le marquage des cellules a été effectué à l'aide de TF2-DEVD-FMK (se liant de manière irréversible au site actif des caspases 3/7) dilué 500 fois (1 :500) avec un temps d'incubation entre une 1 et 4 h à 37°C. Après un lavage en PBS, un volume de 500 µL de tampon de dosage a été additionné aux culots cellulaires marqués. Les analyses cytométriques ont été faites à l'aide d'un cytomètre en flux LSR II Digital (BD Biosciences). La fluorescence de TF2-DEVD-FMK est collectée avec un filtre bande-passe de 530 ± 30 nm. Une acquisition de 10 000 cellules a été réalisée pour chaque échantillon et les données récupérées ont été analysées par le logiciel FlowJo sur une échelle logarithmique.

#### **4.4. Caractérisation de l'autophagie par coloration des vacuoles autophagiques**

Les cellules N2a ont été cultivées sur des lamelles en verre, dans des plaques à 6 puits avec une densité cellulaire de 1,2 x 10<sup>5</sup> cellules / puits, et traitées avec les oxystérols 7KC (25 µM, 50 µM), 7α-OHC (25 µM, 50 µM) et 7β-OHC (12.5 µM, 25 µM) et avec la Rapamycine (500 nM) utilisée comme contrôle positif et la Chloroquine (10 µM et 100 µM), qui est un inhibiteur d'autophagie, utilisée comme contrôle négatif. Les cellules sont pré-traitées par la Rapamycine et la Chloroquine pendant 16-18 heures avant la fin du traitement. Après 72 h de traitement, les lamelles contenant les cellules ont été lavées deux fois par un tampon d'essai 1X (Assay buffer 1X), puis un volume de 100 µL de kit d'autophagie (Réf : ab139484, Abcam) (Microscopy Dual Detection Reagent Green + Hoechst 33342) a été ajouté permettant la détection des vacuoles autophagiques par incubation de 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Ensuite, les lamelles ont été lavées par le tampon d'essai 1X, fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 20 minutes à température ambiante et lavées trois fois par le tampon. Les échantillons ont été

montés entre lame et lamelle avec un milieu de montage Dako (Dako, Copenhague, Denmark) et conservées à l'obscurité à +4°C jusqu'à observation sous un microscope fluorescent couplé à un système Apotome (Zeiss). La fluorescence a été analysée avec le logiciel ZEN (Zeiss).

#### 4.5. Mesure du stress oxydant : mesure par cytométrie en flux des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le fluorochrome dihydroéthidium (DHE)



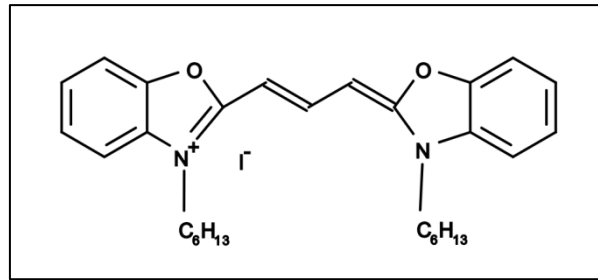
**Figure 37:** Schéma d'oxydation de la Dihydroéthidine (DHE) en Éthidium

Le dihydroéthidium (DHE) est un marqueur utilisé pour mesurer la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ERO) incluant les anions superoxydes ( $O_2^{\bullet -}$ ) provoquant des dommages cellulaires (**Figure 37**). DHE est un composé lipophile non fluorescent capable de traverser librement la membrane cellulaire. Lorsque le DHE réagit avec  $O_2^{\bullet -}$ , il subit une réaction d'oxydation qui le transforme en éthidium (HE) qui va se fixer de façon covalente au niveau des bases de l'ADN permettant sa rétention dans la cellule et l'émission d'une fluorescence orange/rouge ( $\lambda_{Em} \text{ max} = 575 \text{ nm}$ ) en réponse à une excitation bleue (488 nm) (**Rothe & Valet, 1990**).

A une concentration mère de 4 mM, ce fluorochrome a été préparé dans du DMSO. Le culot cellulaire contenant les cellules mortes et vivantes a été suspendu dans une solution de DHE finale de 2  $\mu\text{M}$  et incubé 15 minutes à 37°C, puis immédiatement analysé sur un cytomètre en flux LSR II Digital (BD Biosciences). La fluorescence quantifiée de l'éthidium est collectée par un filtre passe-bande 580 nm sur une échelle logarithmique ; 10 000 cellules sont analysées.

## 5. Evaluation du statut mitochondrial

### 5.1. Mesure par cytométrie en flux du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par coloration au 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))



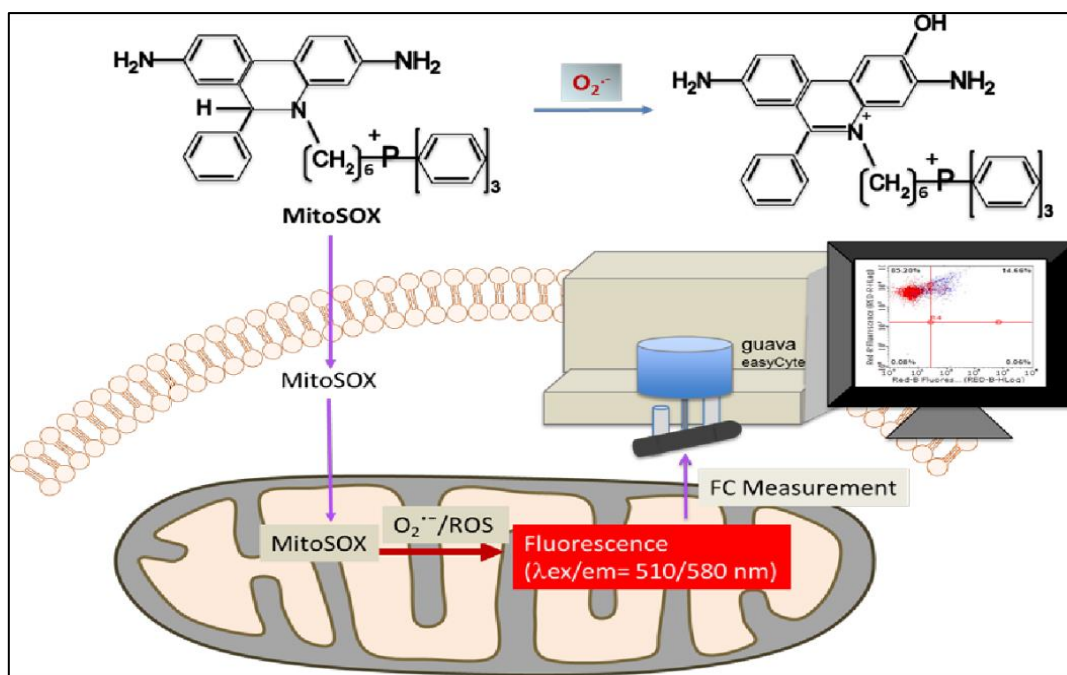
**Figure 38:** Structure chimique du 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))

La mitochondrie, fournissant de l'ATP pour maintenir l'énergie cellulaire, est un organe présent à l'intérieur des cellules eucaryotes. Le potentiel mitochondrial est le résultat de mouvement de protons transmembranaires créant un gradient électrochimique ( $\Delta\Psi_m$ ) de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. La mesure du potentiel membranaire est utilisée pour caractériser précocement l'activité métabolique mitochondriale et la viabilité cellulaire. Le DiOC<sub>6</sub>(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) est un fluorochrome utilisé pour évaluer le  $\Delta\Psi_m$  par cytométrie en flux (Ragot et al., 2013) (Figure 38). Plus le  $\Delta\Psi_m$  est élevé et plus la sonde s'accumule. Ainsi, les mitochondries présentant un  $\Delta\Psi_m$  normal seront plus fluorescentes que des mitochondries dépolarisées présentant un  $\Delta\Psi_m$  faible. Après le traitement par différentes substances et dans différentes conditions, les cellules mortes et vivantes sont récupérées dans un tube, centrifugées 5 minutes à 400g, puis le culot est mis en suspension dans 1 mL de PBS 1X. Le fluorochrome (DiOC<sub>6</sub>(3)) est préparée initialement dans du DMSO à une concentration de 1 mM. Par la suite, une solution intermédiaire de 20  $\mu$ M a été faite afin d'utiliser la concentration finale de 40 nM. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence verte, qui est quantifiée, est collectée par un filtre de bande passante  $520 \pm 20$  nm.

## 5.2. Evaluation de la production des espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial par coloration au MitoSOX Red

La mesure des espèces réactives de l'oxygène (ERO), incluant les anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ), par cytométrie en flux après coloration au MitoSOX Red, permet d'évaluer le stress oxydatif et les perturbations métaboliques qui peuvent affecter la fonction mitochondriale (Kauffman et al., 2016). Le MitoSOX Red est un marqueur fluorescent qui cible spécifiquement les mitochondries et qui réagit avec les ERO et l'anion superoxyde pour produire une fluorescence rouge / orange ( $\lambda_{Ex\ max} = 510\ nm$  ;  $\lambda_{Em\ max} = 580\ nm$ ) (Zarrouk et al., 2012).

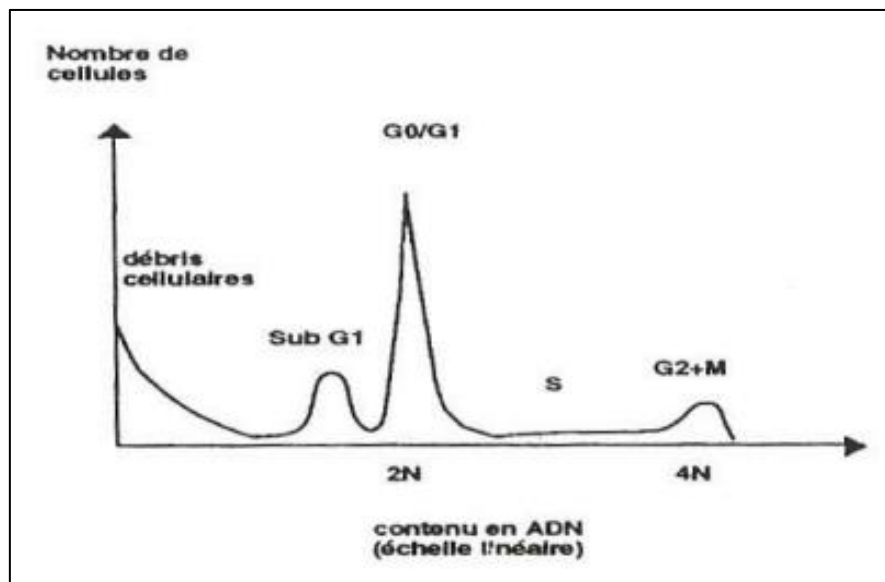
Les cellules traitées ont été détachées par trypsination, lavées dans du PBS 1X, colorées par le MitoSOX Red à une concentration finale de  $5\ \mu M$  et incubées pendant 15 minutes à  $37^\circ C$ . La fluorescence a été collectée par cytométrie en flux sur un filtre de bande passante  $580 \pm 20\ nm$  en prenant en compte 10 000 cellules sur une échelle logarithmique (Figure 39). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo.



**Figure 39:** Schéma d'utilisation du MitoSOX Red pour la détection d'ERO mitochondriaux par cytométrie en flux (Kauffman et al., 2016)

## 6. Mesure du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux permet de détecter les phases du cycle. La première phase, appelée Phase (G0/G1), comporte des cellules quiescentes (G0 ; Gap0) qui sont en dehors du cycle et des cellules (G1 ; Gap1) où il y a synthèse de protéines permettant la division cellulaire. Ensuite, les cellules entrent dans la seconde phase (S ; Synthesis), qui est la phase de synthèse de l'ADN. Dans la troisième phase (G2 ; Gap2), les cellules sont prêtes pour la division cellulaire (M ; Mitosis). L'analyse du cycle cellulaire, par cytométrie en flux, permet aussi de détecter des cellules caractérisées par une fragmentation et/ou condensation de leurs noyaux (cellules contenant de l'ADN caractérisé par une fragmentation internucléosomale) qui se traduit par la présence éventuelle d'un pic SubG1. La proportion de cellules en SubG1, lorsque ce dernier est présent, permet d'estimer le pourcentage de cellules apoptotiques (**Figure 40**).



**Figure 40:** Schéma représentant le pic Sub-G1 par rapport aux autres phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M), analyse par cytométrie en flux (Lizard et al., 1997)

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est mesurée en utilisant une coloration de l'ADN par l'iodure de propidium (IP) suite à un traitement à la RNase A (Sigma-Aldrich). L'IP s'intercale entre les acides nucléiques de manière stœchiométrique en émettant une fluorescence orange / rouge.

Après le détachement des cellules à l'aide de la Trypsine 1X, les cellules mortes et vivantes ont été récupérées dans un tube et un double rinçage avec du PBS a été effectué. Le culot a par la suite été homogénéisé dans 1 mL d'éthanol 80% glacial (-20°C) afin de fixer les cellules. Les

cellules sont fixées ainsi pendant 2 heures à 4°C. Ces cellules fixées sont ensuite réhydratées par deux lavages en PBS 1X et resuspendues dans 300-400 µL de solution contenant PBS 1X / IP 80 µg/mL / RNase A 200 µg/mL pendant une heure à 37°C. Après incubation, les cellules sont analysées par cytométrie en flux et la fluorescence rouge est quantifiée avec un filtre long pass 630 nm en prenant compte 10 000 cellules.

## **7. Analyse protéique par Western Blot**

Le western blot ou « Immunoblotting » est une technique très utile en biologie moléculaire permettant de quantifier et d'identifier une ou plusieurs protéines spécifiques en étudiant leurs expressions, leurs interactions et leurs modifications dans un échantillon protéique après leur séparation par électrophorèse. L'échantillon est séparé par électrophorèse, transféré sur une membrane, puis un anticorps va être utilisé pour reconnaître la protéine d'intérêt. Les étapes de cette méthode sont les suivantes :

### **7.1. Extraction et dosage des protéines**

Les cellules N2a sontensemencées à raison de  $1,4 \times 10^6$  dans des boîtes de Pétri. Les protéines sont extraites à partir de ces cellules suite aux différents traitements effectués. Pour cela, les cellules mortes et vivantes sont collectées par trypsination, lavées deux fois avec du PBS 1X, puis centrifugées pendant 5 minutes à 300 g. Le culot cellulaire (qui peut être stocké à -20°C avant la lyse) est suspendu par la suite dans 100 µL de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 0.5 % sodium déoxycholate, 2 mM EDTA, 1 % NP40, 50 mM NaF, pH 8). La lyse des cellules est réalisée sur de la glace avec le tampon RIPA auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (réf : 11691798001, Roche) pendant 30 minutes dans le but de détruire les membranes et de dégager l'ensemble de contenu cellulaire notamment les protéines. Les lysats sont ensuite centrifugés à 20 000 g pendant 15 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires non lysés. Le surnageant, qui contient les protéines, est récupéré et peut être conservés à -20°C avant le dosage des protéines jusqu'au moment de son utilisation. Toutes ces étapes sont réalisées dans la glace.

Afin de pouvoir déposer des quantités équivalentes de protéines pour chaque condition dans les gels, la concentration des protéines totales a été dosée grâce à un kit bicinchonique (BCA) (Sigma-Aldrich). Ce kit contient un composé coloré qui réagit avec les ions cuivrique Cu(I) pour se transformer en ions cuivreux Cu (II) d'où le virage de la couleur en bleu indiquant la réaction de couplage formés entre l'acide bicinchonique et l'ion cuivreux. Le dosage est effectué dans une plaque à 96 puits avec 1 µL de chaque échantillon auxquels sont ajoutés 24



$\mu\text{L}$  d'eau distillée avec une distribution de 200  $\mu\text{L}$  dans chaque puit du mélange d'ions cuivreux (50 :1) et BCA. Une gamme d'étalonnage est à partir d'une solution de BSA allant de 0 à 25  $\mu\text{g}$  de protéines par puits (le blanc étant remplacé par l'eau). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France). A l'aide d'une courbe étalon réalisée avec de l'albumine bovine sérique, la quantité de protéines totales dans les échantillons est déterminée. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines.

## 7.2. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés de façon à déposer le même volume dans tous les puits ainsi que la même quantité de protéines. Les échantillons sont préparés avec du tampon de charge 4X (pour 20 mL de tampon 4X : 8 mL de glycérol, 4 mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 2 g de SDS, 5 mL de Tris 1 M pH 6,8, quelques cristaux de bleu de bromophénol ; qsp 20 mL), un volume de l'échantillon contenant les protéines (70  $\mu\text{g}$ ) et un volume d'eau ultrapure pour ajuster tous les tubes au même volume final. Les échantillons peuvent être congelés à cette étape.

## 7.3. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes ("Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis" ou SDS-PAGE) est une technique utilisée pour séparer et analyser les protéines en fonction de leurs poids moléculaire avec le système « Protein Electrophoresis Classroom Lab Set 2 » (Biorad). Elle nécessite la dénaturation par la solution tensioactive Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) pour produire des charges linéaires négatives sur les protéines, ce qui les rend mobiles lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. Le gel utilisé pour la séparation est généralement un gel d'acrylamide qui fournit une matrice pour la migration des protéines.

La dénaturation complète des extraits protéiques préparés se fait par la chaleur (95°C) pendant 5 minutes. Ces extraits protéiques sont déposés avec un marqueur de taille (Réf : 1610374, Precision Plus Protein, Standards, BioRad) sur un gel d'acrylamide qui est constitué d'un gel de concentration de 4% et d'un gel de séparation de 8 ou 14% en acrylamide / bisacrylamide. En fonction de la taille de la protéine d'intérêt, le pourcentage en acrylamide du gel de séparation peut varier (**Tableau 3**). Plus la protéine a un poids moléculaire élevé, plus le pourcentage du gel sera faible. Ce gel de séparation est coulé entre deux plaques de verres de 1,5 mm avec l'ajout d'un petit volume d'isopropanol pour éliminer les bulles d'air et avoir une

surface régulière. Le gel de concentration qui est faiblement concentré en acrylamide est coulé en dernier, ce qui permet aux protéines de migrer jusqu'au gel de séparation.

**Tableau 3: Composition des différents gels d'acrylamide**

Solutions mères	Pour gel de séparation 8 % (Vf = 15 mL)	Pour gel de séparation 12 % (Vf = 15 mL)	Pour gel de séparation 14 % (Vf = 15 mL)	Pour gel de séparation 4 % (Vf = 15 mL)
Eau ultrapure	8,15 mL	7,5 mL	6 mL	7,7 mL
Tris Base 1,5 M, SDS 0,4 %, pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	-
Tris Base 1,5 M, SDS 0,4 %, pH 6,8	-	-	-	3 mL
Acrylamide / Bisacrylamide 40 %	3 mL	3,75 mL	5,25 mL	1,2 mL
Persulfate d'ammonium 10 %	75 µL	75 µL	75 µL	100 µL
TEMED	18 µL	18 µL	18 µL	20µL

#### 7.4. Migration des protéines

Les gels sont placés dans une cuve pour la migration, après avoir retirée le peigne du gel de séparation, et sont recouverts par un tampon de migration (Tris base 25 mM, SDS 0,1 %, glycine 190 mM, pH entre 8,3 et 8,8). Les échantillons protéiques (70 µg) sont mélangés avec 5 µL de tampon de charge (Tris-HCl 125 mM ; SDS 4,6 % ; glycérol 20 % ; pH 6,8 ; bleu de Bromophénol 0,003 % ; β-mercaptoéthanol 10 %). Les échantillons sont déposés dans les puits ; un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad) est aussi déposé dans un puits. La migration dans le gel de concentration est appliquée sous un champ électrique de 70 V pendant 30 minutes. Une tension de 110 V pendant une heure et demie est appliquée pour la migration dans le gel de séparation (système Mini-Trans Blot Cell ; BioRad). Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode (+) sous l'effet d'un champ

électrique ce qui permet une séparation selon leurs poids moléculaire en tenant compte que la migration doit être arrêtée avant que le front de migration ne sorte du gel.

### **7.5. Transfert des protéines**

Après la migration des protéines, celles-ci peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose pour être ensuite détectées avec un anticorps spécifique. Cette membrane est imbibée dans un tampon de transfert (Nitrocell membrane-0,45  $\mu$ M, Fisher scientifique). Pour cela, le gel est pris en sandwich comprenant : un scotch britt, deux feuilles de papier Wattman (Dominique Dutsher), le gel d'acrylamide, la membrane de nitrocellulose, deux feuilles de papier Wattman et un scotch britt. Le gel est placé du côté de la borne négative alors que la membrane est située du côté positive. L'ensemble du sandwich est écrasé par un rouleau afin d'éviter la présence des bulles dans le montage qui est ensuite placé dans une cuve de transfert remplie de tampon de transfert (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM). Le transfert est effectué à 50V pendant 35 à 45 minutes en fonction de la taille de la protéine à détecter avec refroidissement et sous agitation.

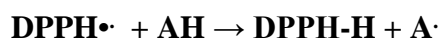
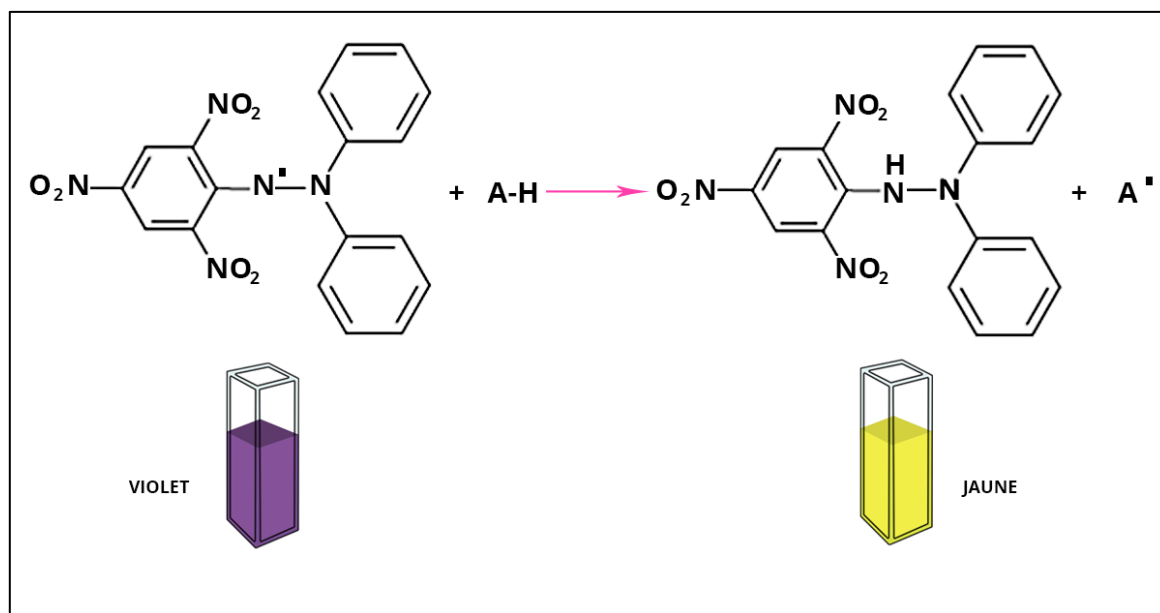
Lorsque le transfert est achevé, la membrane est incubée pendant une heure sous agitation dans une solution de saturation (PBS 1X ; 0,1 % Tween-20) à laquelle 5 % de lait écrémé est ajouté. L'incubation des anticorps primaires est faite à 4°C pendant une nuit, ensuite la membrane est lavée 3 fois pendant 5 minutes par une solution de PBS-Tween 0,1 % et incubée pendant une heure sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Horse Radish Peroxidase). Afin d'éliminer l'excès d'anticorps, 3 lavages successifs sont faits par la solution de PBS-Tween 0,1 %. En dernière lieu, la membrane est révélée à l'aide d'un kit chimioluminescence (Réf : 34096, SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Fisher Scientific)). Le signal est mesuré et digitalisé avec l'appareil Chemidoc XRS+ (BioRad) ; l'analyse de la densitométrie des bandes obtenues est réalisée avec le logiciel Image Lab (BioRad).

### **8. Mesure de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des aza-stilbènes.**

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des aza-stilbènes ainsi que du resvératrol a été déterminée en appliquant des tests complémentaires : DPPH, FRAP, chélation des ions ferreux, KRL et PAOT (Ksila et al., 2022).

### 8.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH.)

D'après la méthode décrite par Ching-Yun Hsu (Hsu et al., 2013), le test de piégeage du radical libre est effectué en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui est un radical libre instable qui peut être piégé par des antioxydants présents dans la substance testée ; ceci provoque une réduction de ce radical par une substance donneuse de protons conduisant à la formation de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH-H) d'où le virage de la couleur violette à un brun jaunâtre (Figure 41).



(violet)

(jaunâtre)

**Figure 41:** Structure chimique du radical synthétique radicalaire DPPH et du DPPH-H (non radicalaire)

Pour la mesure de l'activité, une prise de 50  $\mu\text{L}$  ml de chaque extrait méthanolique ou du standard (acide ascorbique) à différentes concentrations (de 0,016 mg / mL jusqu'à 2 mg / mL) est mise en présence de 950  $\mu\text{L}$  d'une solution de DPPH $\cdot$  ( $10^{-4}$  M). Le mélange est placé pendant 30 minutes à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule suivante :

$$\text{PI} = (\text{A}_0 - \text{A}_1 / \text{A}_0) * 100$$

Avec

**PI** : Pourcentage d'Inhibition.

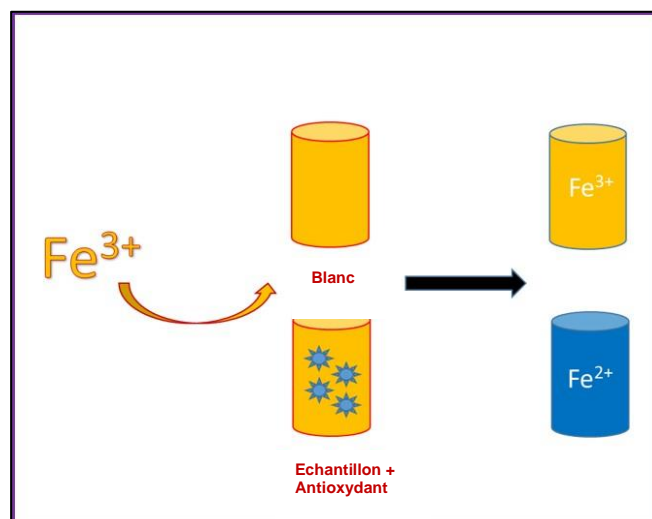
**A<sub>0</sub>** : Absorbance de la solution de DPPH.

**A<sub>1</sub>** : Absorbance de l'essai ou du standard.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des essais permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>). Une valeur d'IC<sub>50</sub> faible, exprimée en mg / mL, correspond à une grande efficacité de l'extrait.

## 8.2. Test d'évaluation de l'activité réductrice d'antioxydants contre les ions de fer : FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power)

L'activité réductrice d'antioxydants contre les ions de fer est réalisée suivant la méthode décrite par Bassene (**Bassene, 2012**). Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) est basé sur la réduction de Fe<sup>3+</sup> (ions ferriques), présents dans hexacyanoferrate de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), en Fe<sup>2+</sup> (ions ferreux) (**Figure 42**).



**Figure 42:** Principe de la technique FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power)

A faible pH, en présence de 2,4,6-Tris(2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ, Sigma Aldrich, France), le complexe ferrique-tripyridyltriazine (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) est réduit en ferreux (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) avec la formation d'une couleur bleue intense avec un maximum d'absorption à 593 nm. Brièvement, 2,3 mL de réactif FRAP (contient 100 mL de tampon acétate 0,3 M, pH 3,6 ; 20 mL de solution de 10 mM de TPTZ dans 40 mM de tampon acétate). TPTZ dans 40 mM HCl ; et 20 mL de 20 mM FeCl<sub>3</sub>) ont été mélangés avec 0,7 mL du produit (resvératrol ou aza-stilbène I-VII) à différentes concentrations. Le mélange a été ensuite incubé à 37 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 593 nm par rapport à un blanc contenant tous les

réactifs, sauf l'échantillon, à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas Xenus, Monaco). L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation de la capacité de réduction. Les résultats des échantillons ont été exprimés en  $\mu\text{Mol}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  réduit par  $\text{mM}$  de resvératrol et d'aza-stilbènes à partir d'une courbe de calibration standard de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

L'activité antioxydante liée au pouvoir réducteur des extraits est exprimée en pourcentage de pouvoir réducteur selon la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = (A_0 - A_1 / A_0) * 100$$

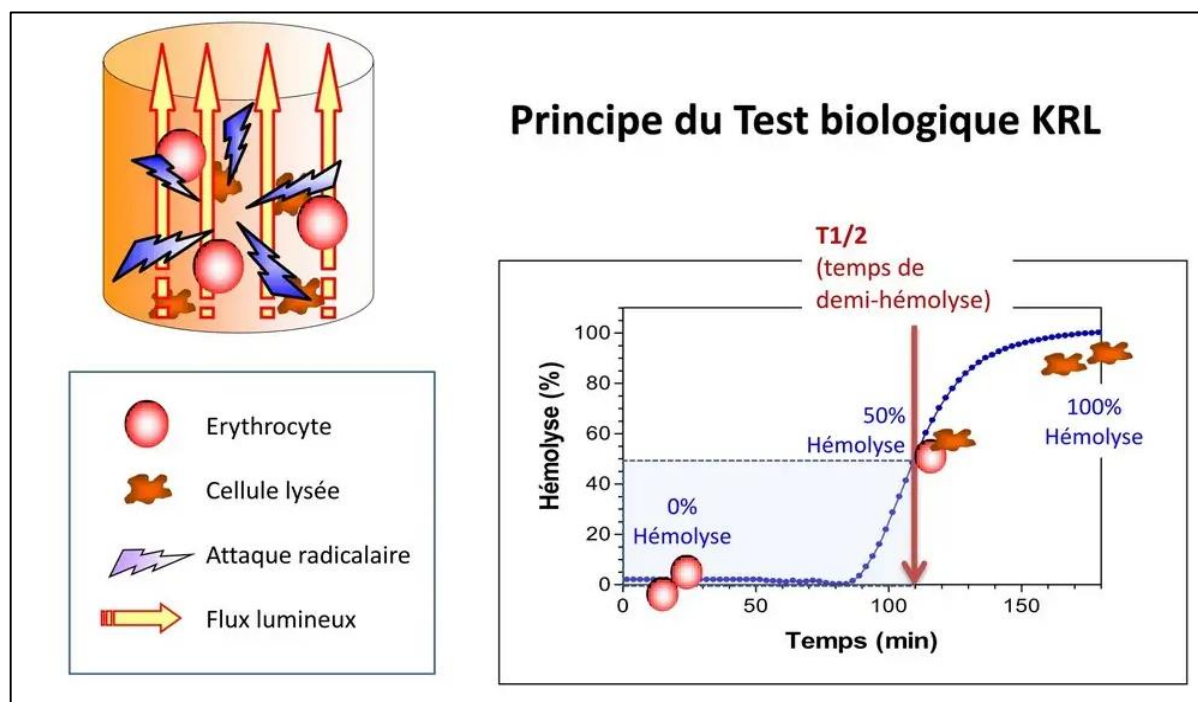
Avec

**A<sub>0</sub>** : Absorbance de l'extrait ou du standard.

**A<sub>1</sub>** : Absorbance du blanc

### 8.3. Test KRL (Kit Radicaux Libres)

Le test KRL (Kit Radicaux Libres) a été utilisé pour évaluer l'activité antioxydante globale des huiles par leur capacité à protéger les érythrocytes contre une attaque contrôlée de radicaux libres à des concentrations variables de AAPH (Zhang et al., 2012) (Figure 43). Cette attaque radicalaire provoque la mobilisation des capteurs de radicaux présents dans le sang et la neutralisation des processus d'oxydation ((Rossi et al., 2013; Zarrouk et al., 2019)).



**Figure 43:** Principe du test KRL (Kit Radicaux Libres ; Société Lara-Spiral, Couternon, France)

Des échantillons de sang de contrôle dilués dans du DMSO ont été exposés à des radicaux libres organiques générés à 37°C par la décomposition thermique d'une solution de 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) conduisant à une oxydation par l'oxygène moléculaire. Afin d'enregistrer l'hémolyse, l'augmentation de densité optique due à l'hémoglobine a été mesurée à 540-560 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (KRL Reader, Kirial International ; Couternon, France).

La résistance globale du sang témoin à l'attaque radicalaire en absence et en présence d'AAPH est exprimée par le temps au cours duquel 50% des cellules sanguines sont lysées ( $T_{1/2}$  en minute) alors que l'activité antioxydante des échantillons d'huile testés a été exprimée en équivalents Trolox et en équivalents d'acide gallique.

Cette technique a été réalisée par le laboratoire Lara-Spiral (Dr Philippe Durand / Dr Michel Prost, Couternon, France).

#### 8.4. PAOT (Pouvoir Antioxydant Total)

Le pouvoir antioxydant total du RSV et des AZA-STs a également été déterminé par PAOT Liquid® Technology (brevet FR1871986 ; 11.28.2018 ; <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/066776410/publication/US2022031230A1?q=FR1871986> ; consulté le 10 avril 2023). Cette méthode est basée sur une réaction électrochimique avec une molécule à l'état de radical libre (médiateur  $M^{\cdot-}$ ), selon l'équation (1) (Kotora et al., 2016).



L'analyse commence par la mesure du potentiel électrochimique (contrôle EP t0) du milieu réactionnel (1 mL), puis 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont ajoutés. Le produit du potentiel (produit EP t4) a été enregistré après 4 min d'interaction entre l'échantillon qui contient des antioxydants et le médiateur réduit  $M^{\cdot-}$ .

Le rapport de variation des formes oxydées et réduites du médiateur  $M^{\cdot-}$  pendant la réaction de réduction donne une estimation de l'activité antioxydante dans l'échantillon en utilisant l'équation (2).

$$\text{Activité antioxydante} = X \text{ 100\% (2)}$$

Les résultats ont été exprimés en score PAOT par litre (PAOT score / L) de l'échantillon analysé.

#### 9. Analyse du profil des acides gras

Les lipides totaux ont été extraits à partir des huiles selon la méthode décrite par Moilanen & Nikkari (Moilanen & Nikkari, 1981). Les lipides sont trans-méthylés avec du méthanol-trifluorure de bore ( $\text{BF}_3$  à 14 %) en utilisant la méthode de Morrison & Smith (Morrison & Smith, 1964). Ensuite, les esters méthyliques d'acides gras sont analysés par CPG. 1  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon est injecté dans le système de CPG (Hewlett Packard Modèle 5890, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne CP-88 SIL (100 mx 0,25 mm de diamètre interne, l'épaisseur du film de 0,20 mm, Varian, Les Ulis, France). La température du four est maintenue à 60°C pendant 5 min, augmentée jusqu'à 165°C à raison de 15°C/min, maintenue pendant 1 min à cette température, puis chauffée à 225°C à raison de



2°C/min et enfin maintenue à 225°C pendant 17 min. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur. L'injecteur et le détecteur sont maintenus à 250°C. Le pourcentage de chaque acide gras est exprimé en rapportant l'aire de chaque pic d'acide gras à la somme des aires de tous les pics d'acides gras détectés.

## **10. Analyse des phytostérols**

L'analyse des phytostérols est basée sur un isolement de la fraction insaponifiable puis une silylation de la fraction insaponifiable avant une injection directe en chromatographie en phase gazeuse.

### **10.1. Isolement de la fraction insaponifiable**

Le principe de cette technique repose sur la saponification d'une prise d'essai de 50 mg d'huile par 5 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (1 N), et 25 µL de cholestanol utilisé comme standard interne (1 mg/mL). Le mélange est incubé à température ambiante pendant une nuit. Après l'ajout de 10 mL d'eau distillée et 10 mL de dichlorométhane, le mélange est agité vigoureusement et centrifugé à 1120 g pendant 3 min. La fraction organique est transférée dans un deuxième flacon. La matière insaponifiable est extraite deux fois avec du dichlorométhane (10 mL). Les extraits de dichlorométhane sont lavés avec 5 mL d'eau distillée jusqu'à neutralité. Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote à 40°C.

### **10.2. Silylation de la fraction insaponifiable**

Les dérivés de stérol ont été préparés selon Park & Addis (**Park & Addis, 1985**). Le résidu a été mélangé avec 300 µL de bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA) (avec 1 % triméthylchlorosilane) (TMCS) et 50 µL de pyridine. Le mélange est chauffé à 60°C pendant 30 min après élimination du dichlorométhane,

### **10.3. Identification des stérols**

L'analyse des stérols est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Le système de CPG utilisé est un Hewlett-Packard HP-4890D équipé d'un DB-5MS, fusionné à une colonne capillaire de silice (30 m x 0,25 mm d'épaisseur de film de 0,25 µm). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont à 290°C. L'hélium est utilisé comme gaz porteur à une pression d'entrée de 120 kPa. L'injection se fait en mode avec division avec un rapport de 1/20. Les stérols sont identifiés par leurs temps de rétention par rapport à l'étalon interne (cholestanol). Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme lipidomique

(Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne-CHU Dijon- INSERM, Responsable: Dr Jean-Paul Pais de Barros, Dijon, France).

## **11. Analyse des tocophérols**

L'analyse des tocophérols a été réalisée sur la plateforme d'analyse lipidomique (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne-CHU Dijon- INSERM). Les échantillons d'huile sont dilués 10 fois avec de l'hexane. Une quantité de 5 mg de chaque échantillon dilué est mélangée pendant 1 min avec 200  $\mu$ L de solution saline, 200  $\mu$ L d'éthanol/BHT (50 mg/L) contenant du Tocol utilisé comme standard interne (1 ng/ $\mu$ L) et 500  $\mu$ L d'hexane. Les extraits sont centrifugés à 10000 g pendant 5 min à 4°C. La couche supérieure est recueillie dans un nouveau tube et évaporée à sec sous un flux d'azote. Les extraits séchés sont mis en suspension avec 50  $\mu$ L de méthanol/BHT (50 mg/L) et centrifugés à 10000 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants sont finalement transférés dans un flacon d'injection. 2  $\mu$ L de chaque extrait sont injectées par un passeur automatique. La séparation est effectuée par HPLC 1260 (Agilent Technologies) en utilisant un gradient linéaire de méthanol (90 % jusqu'à 100 % en 5 min, et maintenu à 100 % pendant 3 min). La détection est réalisée avec un détecteur de lumière à fluorescence (Agilent Technologies) à  $\lambda_{\text{Ex max}}$  292 nm et  $\lambda_{\text{Em max}}$  325 nm. Les étalons des tocophérols (0-800 ng) sont extraits avec le même protocole que les échantillons. Les rapports de surface de tocophérols (Temps de rétention (RT) = 5,4 min) au tocol (RT = 4,0 min) sont calculés pour les échantillons et les standards de calibrage.

## **12. Dosage des oxystérols cellulaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**

### **12.1. Saponification des acides gras**

Les acides gras sont présents en quantités importantes dans le plasma. La phase pré-analytique fait intervenir une étape de saponification, d'extraction et de dérivation (**Annexe 1**).

### **12.2. Extraction et dérivation des oxystérols plasmatiques**

Une saponification initiale permet d'obtenir les oxystérols totaux qui sont ensuite extraits et dérivatisés. Cette étape sert à rendre les échantillons plus volatiles, moins polaires et plus stables thermiquement afin qu'ils soient analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS). L'extrait sec est repris avec 100  $\mu$ L d'un mélange N, O-Bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) / chlorure triméthylsilyle (TMCS) (4v/1v) préparé extemporanément et incubé à 80°C pendant une heure. Les échantillons sont évaporés

sous flux d'azote et repris dans 100  $\mu$ L d'hexane puis transférés dans des tubes en verre afin d'être injectés dans le chromatographe (**Annexe 2**).

### **12.3. Analyse des oxystérols par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**

La chromatographie en phase gazeuse sert à séparer les composés d'un échantillon, tandis que la spectrométrie de masse consiste en plus à identifier chimiquement les composés selon leur rapport masse / charge ( $m/z$ ). Cette technique est effectuée grâce à un appareil Agilent Technology 6890 équipé d'un détecteur sélectif de masse 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) et d'un injecteur HP7683. Les analyses de GC-MS ont été faites sur la plateforme de Lipidomique (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne – CHU Dijon – INSERM, Responsable : Dr Jean-Paul Pais de Barros, Dijon, France).

### **12.4. Caractérisation des constituants des huiles essentielles**

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur un appareil GC Shimadzu, modèle GC-MS QP2010SE équipé d'un analyseur quadripôle d'une source ESI (Electro-Spray Ionisation), d'un injecteur automatique passeur d'échantillons AOC-20i, d'un injecteur en mode split programmé à 240°C et d'une colonne capillaire DB-5MS (dimensions : 30 m (longueur) x 0,25 mm (diamètre interne)) Agilent Technologies (Réf. 122-5532UI, n° lot USR720566H). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur, la vitesse linéaire est fixée à 36,8 cm/sec. La température de la source est réglée à 220°C et la température de l'interface à 240°C. L'acquisition des données, le contrôle et le pilotage des instruments sont effectués à l'aide du logiciel LabSolutions GC version 4.45. Les paramètres du gradient sont les suivants : la température du four est programmée à 50°C pendant 5 min, puis à raison 3°C/min jusqu'à 240°C. La durée de l'analyse est de 68,33 min. L'identification des composés est réalisée par comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux de la banque de données NIST (National Institute of Standards and Technology).

## **13. Analyses statistiques**

L'analyse statistique des résultats expérimentaux a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La comparaison des données des résultats *in vitro* a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni permettant de multiples comparaisons et d'évaluer toutes interactions. Une valeur (\*) :  $p \leq 0.05$  est considérée statistiquement significative.

---

# RÉSULTATS

---

## **I. Caractérisation des activités des AZA-STs comparativement au trans-resvératrol (RSV)**

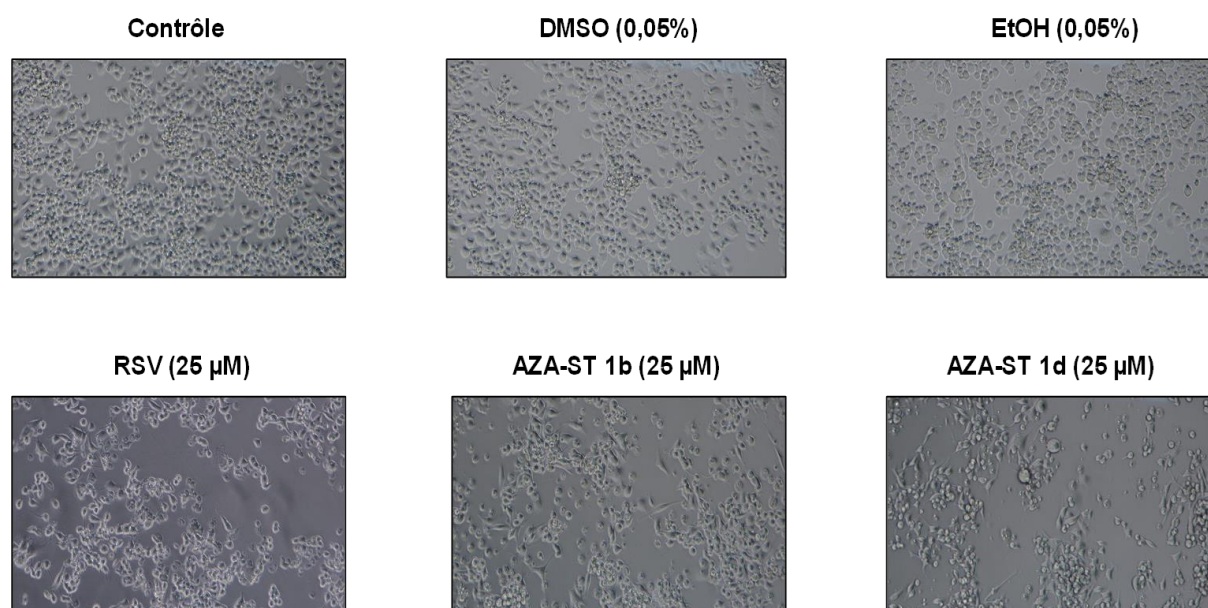
Ce travail a actuellement fait l'objet de 3 publications : 2 publications relatives aux travaux de recherche et 1 revue (**Annexe 6, Publications 1,2 et 3**).

### **1. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol (RSV) sur la morphologie cellulaire (microscopie à contraste de phase)**

Après 48h de traitement en présence ou en absence d'AZA-STs ou avec du RSV (6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M), la densité et la morphologie cellulaire des cellules neuronales murines N2a ont été abordées à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Allemagne) équipé d'un appareil photo numérique (Axiocam ICm1, Zeiss).

Seules les images des cellules traitées avec les molécules (RSV, AZA-ST 1b et AZA-ST 1d à 25  $\mu$ M) ayant la plus forte toxicité sont montrées dans la **Figure 44**.

En microscopie à contraste de phase, comparativement au contrôle et aux véhicules, les cellules N2a, cultivées pendant 24h et traitées pendant 48h par les différentes molécules à différentes concentrations (6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M), présentent une augmentation des cellules mortes, qui sont des cellules rondes et flottantes et une diminution des cellules vivantes qui sont adhérentes. Ces critères morphologiques ont été observés en particulier avec des cellules traitées par RSV, AZA-ST 1b et AZA-ST 1d (25  $\mu$ M) montrant des effets cytotoxiques plus élevés par rapport aux autres analogues imines du RSV.



**Figure 44:** Analyse morphologique des cellules neuronales murines N2a par microscopie à contraste de phase. Les cellules neuronales murines N2a ont été cultivées pendant 24h et incubées pendant 48h avec ou sans RSV et ses dérivés (6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$ ). Les observations ont été effectuées par microscopie à contraste de phase. Les cellules mortes sont caractérisées par un aspect rond et flottant, tandis que les cellules vivantes restent adhérentes (Grossissement :  $\times 150$ ).

## 2. Evaluation de la toxicité des AZA-STs et du trans-resvératrol sur les cellules N2a

Plusieurs analyses ont été effectuées dans une gamme de concentration de 1,5  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$  afin de déterminer les effets cytotoxiques des AZA-STs comparativement au RSV qui est connu par ses activités différenciatrices sur les cellules N2a à de faibles concentrations (6,25  $\mu\text{M}$  et 12,5  $\mu\text{M}$ , 48h) (Namsi et al., 2018), et par son potentiel à induire la mort cellulaire avec des concentrations supérieures à 12,5  $\mu\text{M}$  (Yammine, et al., 2020).

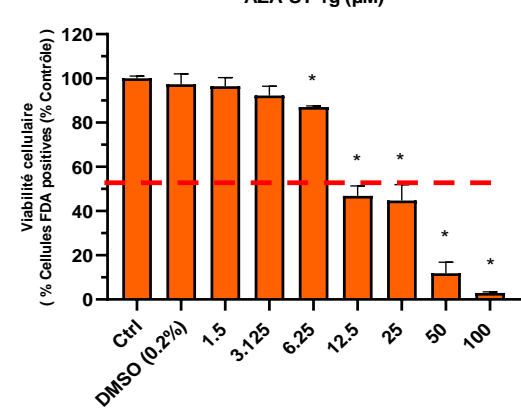
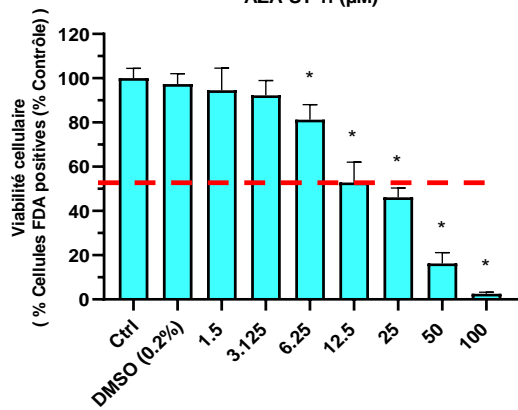
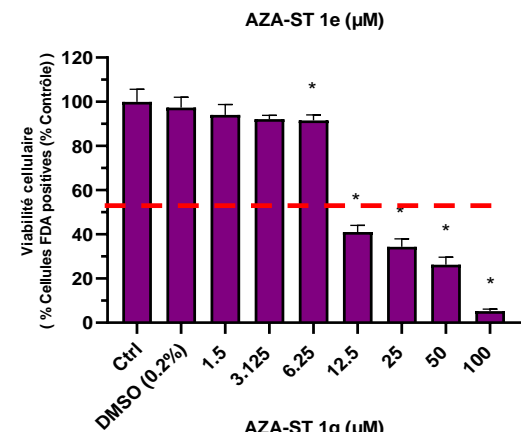
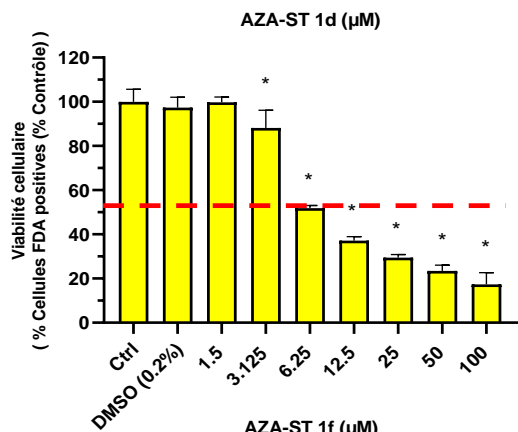
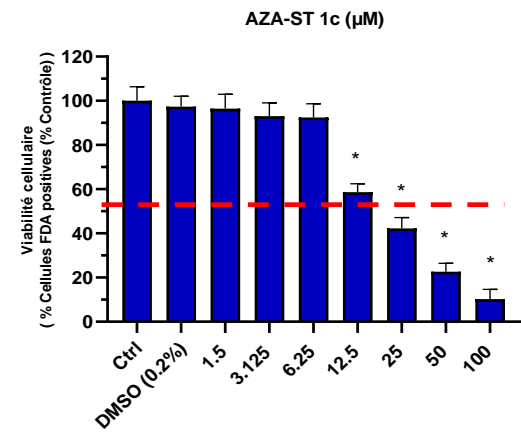
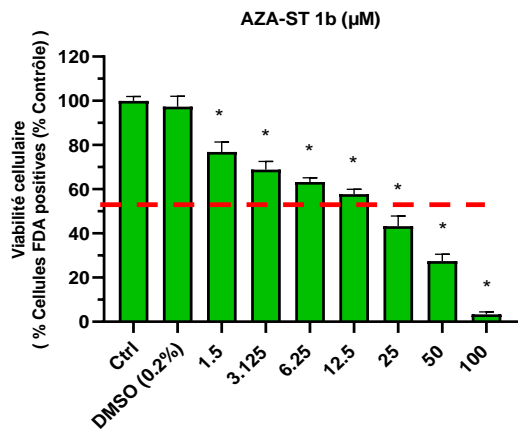
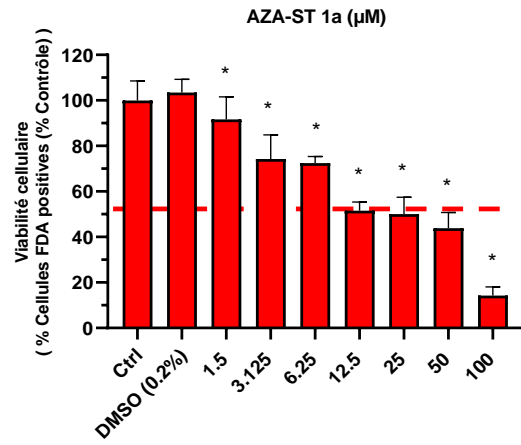
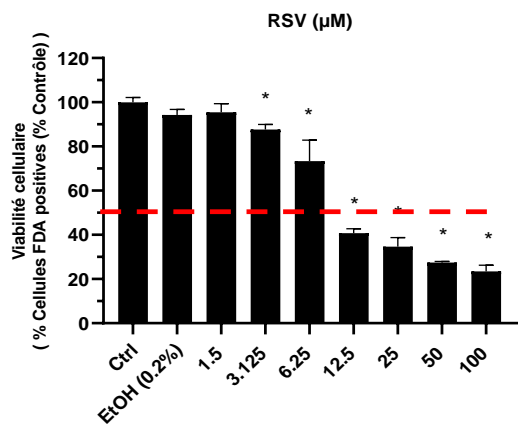
Dans notre étude, trois tests complémentaires ont été réalisées pour évaluer les activités cytotoxiques des AZA-STs en comparaison par rapport au RSV.

### 2.1.Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la viabilité cellulaire par mesure de l'activité estérase (test FDA)

Les activités des AZA-STs, comparativement au RSV, sur la viabilité cellulaire ont été quantifiées par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) en mesurant l'activité estérase sur

des cellules N2a cultivées pendant 24h et traitées pendant 48h avec les différents AZA-STs (1a-1g) et le RSV.

Les résultats montrent que la diminution de la viabilité cellulaire, sous traitement au trans-resvératrol et aux aza-stilbènes, est associée à une réduction du pourcentage des cellules FDA positives correspondant aux cellules vivantes, ce qui indique une perte et une diminution concentration-dépendante de l'activité estérase. En se basant sur les IC50 (concentration inhibitrice 50%) déterminées par le test FDA, les effets cytotoxiques des différentes molécules testées étaient dans l'ordre suivant : AZA-ST 1d (IC50  $\approx$  6,25  $\mu$ M) > RSV (6,25  $\mu$ M < IC 50 < 12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1e (6,25  $\mu$ M < IC50 < 12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1g (IC50  $\approx$  12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1f (IC50  $\approx$  12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1a (IC50  $\approx$  12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1b (12,5  $\mu$ M < IC50 < 25  $\mu$ M) > AZA-ST 1c (12,5  $\mu$ M < IC50 < 25  $\mu$ M) (**Figure 45**).





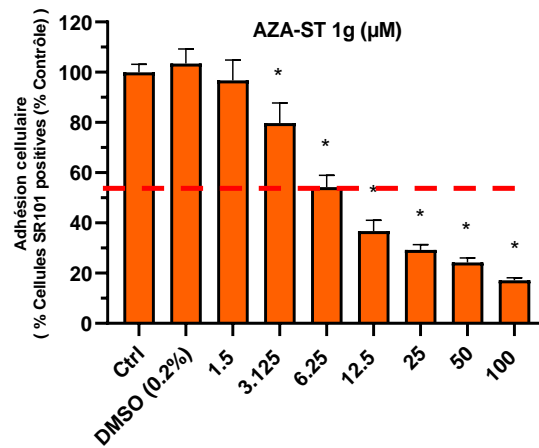
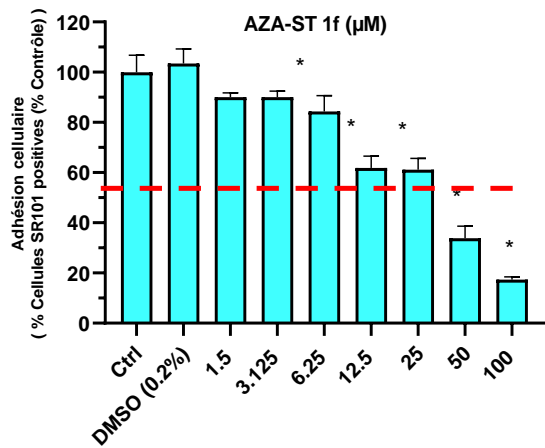
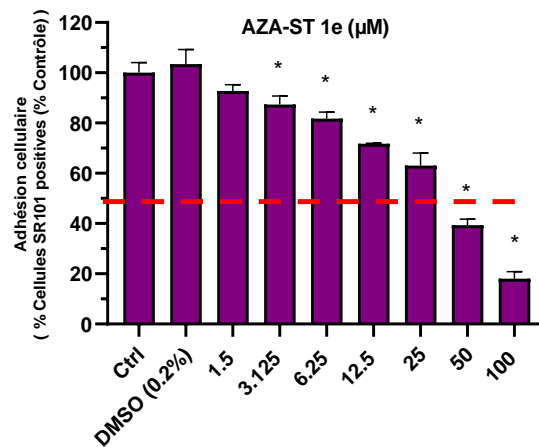
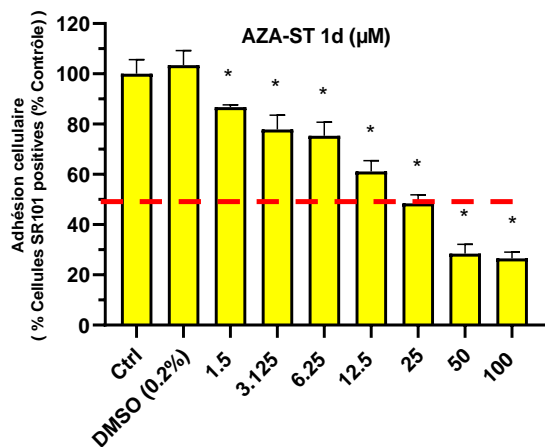
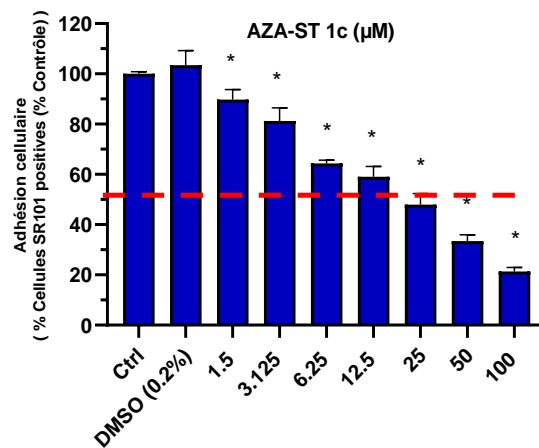
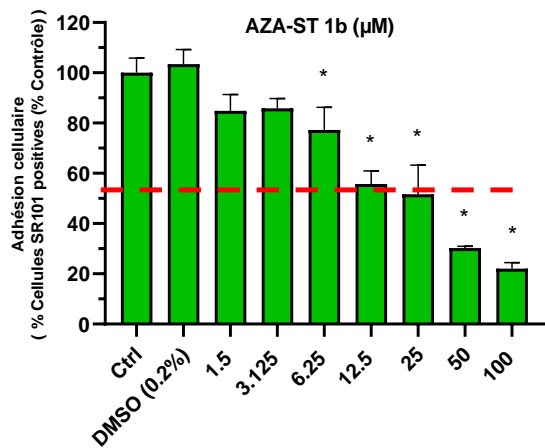
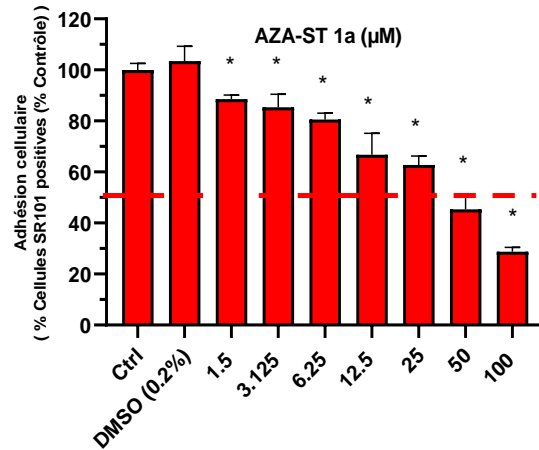
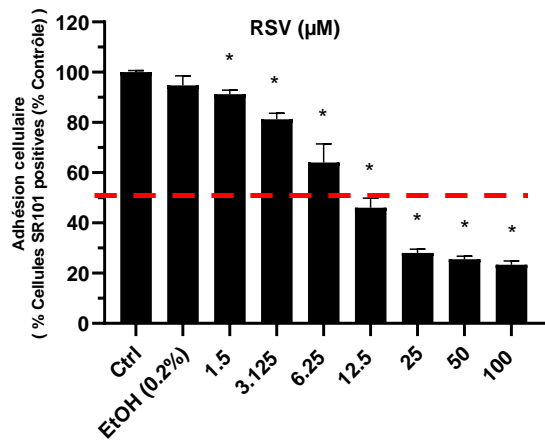
**Figure 45:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la viabilité cellulaire.

*Evaluation par le test FDA des effets du RSV et de l'AZA-ST 1a à 1g sur la viabilité cellulaire. Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans RSV ou AZA ST 1a à 1g dans une gamme de concentrations de 1,5 à 100  $\mu$ M. La ligne pointillée rouge indique la valeur de la concentration (ou la gamme de concentrations) réduisant viabilité cellulaire de 50 % (IC50). Les résultats présentés sont la moyenne SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de t-Student. Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée statistiquement significative, est indiquée par une étoile (\*) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle).*

### **2.2.Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur l'adhésion cellulaire (test Sulforhodamine 101)**

La cytotoxicité du RSV et des AZA-STs a été également évaluée par le test de coloration à la Sulforhodamine 101 (SR 101) qui donne des informations sur la densité cellulaire, ce qui reflète l'adhésion et la croissance des cellules.

La diminution de la fluorescence constatée par le dosage SR 101 explique la baisse de la densité cellulaire, induite par le RSV et les sept AZA-STs utilisés, associée à une perte significative d'adhésion cellulaire, ce qui provoque une augmentation ces cellules mortes (cellules flottantes) dans le milieu de culture ; aucune différence n'a été remarquée entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées par les véhicules (EtOH 0,2% pour RSV et DMSO 0,2% pour les AZA-STs). En effet, la cytotoxicité du trans-resvératrol et des aza-stilbènes était dans l'ordre suivant : AZA-ST 1g (IC50  $\approx$  6,25  $\mu$ M) > RSV (IC50  $\approx$  12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1b (IC50  $\approx$  12,5  $\mu$ M) > AZA-ST 1d (IC50  $\approx$  25  $\mu$ M) > AZA-ST 1c (IC50  $\approx$  25  $\mu$ M) > AZA-ST 1e (25  $\mu$ M < IC50 < 50  $\mu$ M) > AZA-ST 1f (25  $\mu$ M < IC50 < 50  $\mu$ M) > AZA-ST 1a (25  $\mu$ M < IC50 < 50  $\mu$ M) (**Figure 46**).

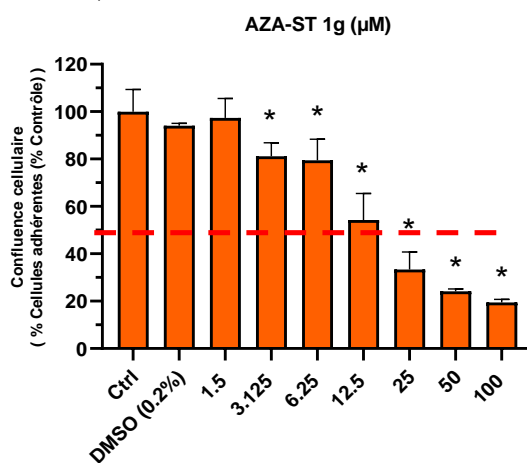
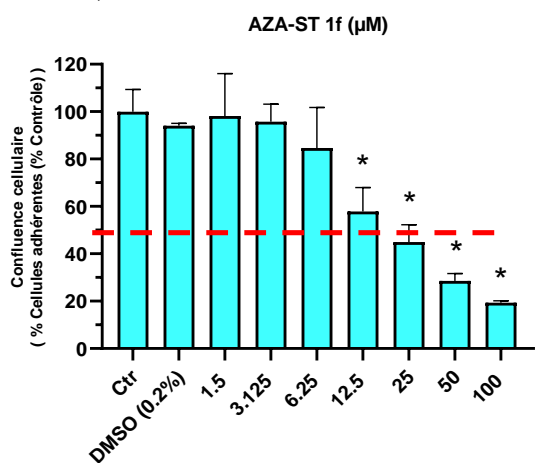
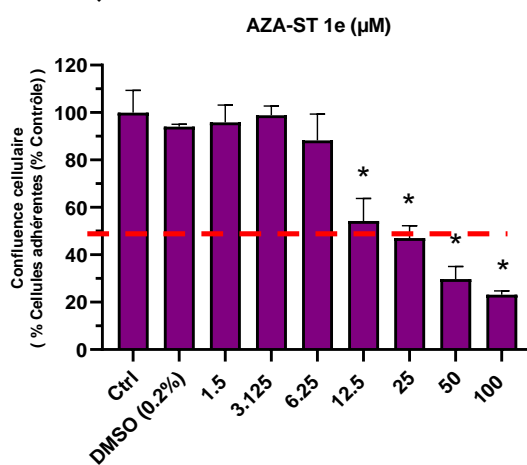
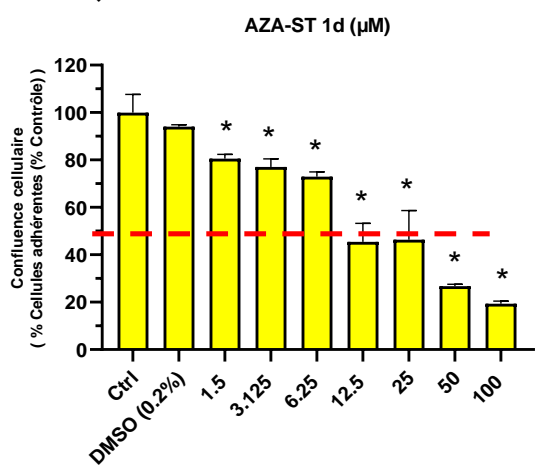
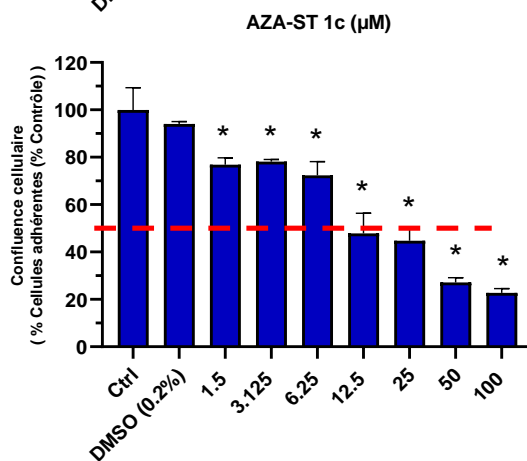
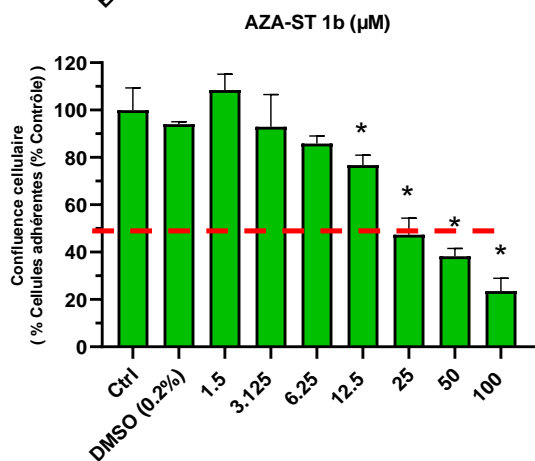
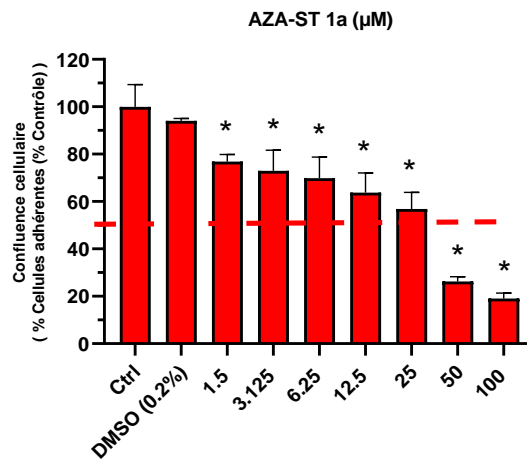
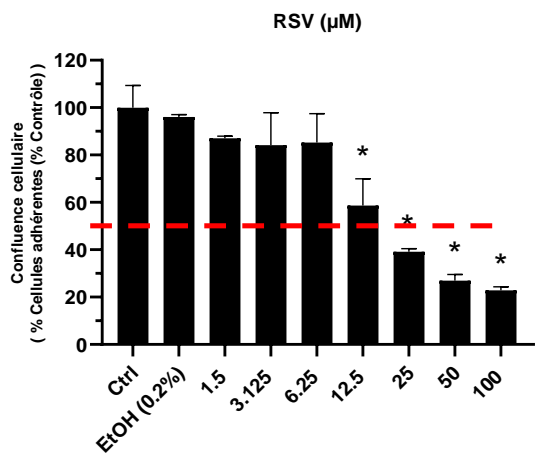


**Figure 46:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur l'adhésion cellulaire.

*Evaluation par un test Sulforhodamine (SR 101) des effets du RSV et de l'AZA-ST 1a à 1g sur l'adhésion cellulaire. Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans RSV ou AZA-ST 1a à 1g dans une gamme de concentrations allant de 1,5 à 100  $\mu$ M. La ligne pointillée rouge indique la valeur de la concentration (ou la gamme de concentrations) réduisant viabilité cellulaire de 50 % (IC<sub>50</sub>). Les résultats présentés sont la moyenne SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisé en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de t-Student. Une valeur  $p \leq 0.05$ , considérée significative statistiquement, est indiquée par une étoile (\*) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle).*

### 2.3.Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la confluence cellulaire (test Crystal Violet)

L'impact du RSV et de ses dérivés AZA-STs (1a-1g) sur la croissance cellulaire a été examiné par une gamme de différentes concentrations (1,5, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 et 100  $\mu$ M) en réalisant le dosage du Crystal violet permettant de quantifier les cellules adhérentes. Les IC<sub>50</sub> calculées contribuent à obtenir les valeurs suivantes : AZA-ST 1c (IC<sub>50</sub>  $\approx$  11,30  $\mu$ M  $\pm$  0,57) > AZA-ST 1d (IC<sub>50</sub>  $\approx$  11,48  $\mu$ M  $\pm$  0,57) > AZA-ST 1g (IC<sub>50</sub>  $\approx$  11,75  $\mu$ M  $\pm$  0,58) > AZA-ST 1e (IC<sub>50</sub>  $\approx$  12,43  $\mu$ M  $\pm$  0,62) > AZA-ST 1f (IC<sub>50</sub>  $\approx$  13,95  $\mu$ M  $\pm$  0,69) > RSV (IC<sub>50</sub>  $\approx$  14,95  $\mu$ M  $\pm$  0,74) > AZA-ST 1b (IC<sub>50</sub>  $\approx$  19,49  $\mu$ M  $\pm$  0,97) > AZA-ST 1a (IC<sub>50</sub>  $\approx$  25  $\mu$ M  $\pm$  1,25). D'après ce test, la diminution concentration-dépendante de l'adhésion cellulaire se reflète avec des IC<sub>50</sub> comprises entre 6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M) (**Figure 47**).



**Figure 47:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la confluence cellulaire.

*Evaluation par le test Crystal Violet des effets du RSV et des AZA-ST 1a à 1g sur la confluence cellulaire. Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans RSV ou AZA- ST 1a à 1g dans une gamme de concentrations de 1,5 à 100  $\mu$ M. La ligne pointillée rouge indique la valeur de la concentration (ou la gamme de concentrations) réduisant viabilité cellulaire de 50 % (IC50). Les résultats présentés sont la moyenne SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisé en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de t-Student. Une valeur  $p \leq 0.05$ , considérée significative statistiquement, est indiquée par une étoile (\*) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle).*

Les résultats obtenus des trois tests complémentaires (FDA, SR101 et Crystal Violet), permettant d'évaluer les activités cytotoxiques des aza-stilbènes comparativement au trans-resvératrol et de déterminer leurs IC50, sont résumés dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4:** Valeurs des IC50 des AZA-STs (1a-1g) et du RSV obtenues avec le test FDA (viabilité cellulaire et mesure de l'activité estérase), par le test SR101 (adhésion cellulaire) et par le test Crystal violet (confluence cellulaire)

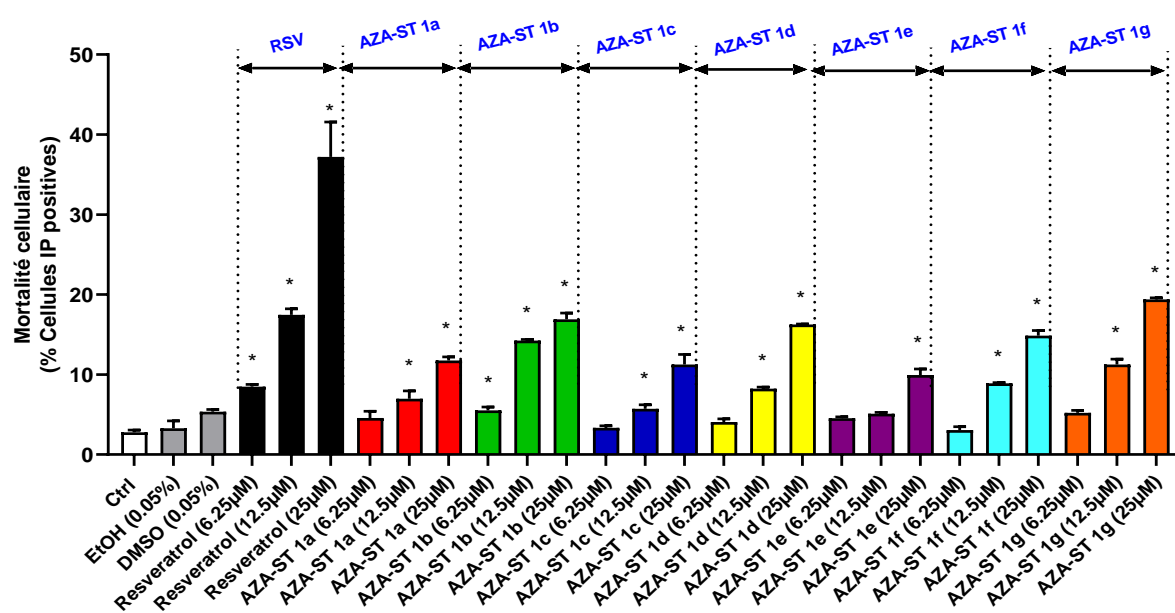
	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	IC50 ( $\mu$ M) (FDA)	IC50 ( $\mu$ M) (SR101)	IC50 ( $\mu$ M) (Crystal Violet)
<b>RSV</b>	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,24	6,25 < IC50 < 12,5	≈ 12,50	≈ 14,95 ± 0,74
<b>AZA-ST 1a</b>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213,228	12,5	25 < IC50 < 50	≈ 25 ± 1,25
<b>AZA-ST 1b</b>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213,228	12,5 < IC50 < 25	12,5	≈ 19,49 ± 0,97
<b>AZA-ST 1c</b>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213,228	12,5 < IC50 < 25	25	≈ 11,30 ± 0,57
<b>AZA-ST 1d</b>	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	229,228	6,25	25	≈ 11,48 ± 0,57
<b>AZA-ST 1e</b>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	227,254	6,25 < IC50 < 12,5	25 < IC50 < 50	≈ 12,43 ± 0,62
<b>AZA-ST 1f</b>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276,11	12,5	25 < IC50 < 50	≈ 13,95 ± 0,69
<b>AZA-ST 1g</b>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276,11	≈ 12,5	6,25	≈ 11,75 ± 0,58

### 3. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la perméabilité de la membrane plasmique : évaluation par coloration à l'iodure de propidium

La toxicité provoquée par les différentes molécules étudiées a été associée à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique considérée comme un critère de mort cellulaire (Yeh et al., 1981). Cette mort cellulaire induite par le RSV et les AZA-STs (1a-1g) est associée à une altération de la membrane plasmique (Lizard et al., 1995). L'intégrité membranaire a été déterminée avec l'iodure de propidium (IP) qui est un fluorochrome qui ne s'intercale irréversiblement au niveau des acides nucléiques (ADN, ARN) que dans les cellules ayant des membranes plasmiques endommagées considérées comme des cellules mortes.

Après 24h de culture, les cellules N2a ont été traitées par le RSV et les différents AZA-STs avec des concentrations de l'ordre de 6,25, 12,5 et 25  $\mu\text{M}$  pendant 48h. Les résultats obtenus sont résumés dans la **Figure 48**.

L'analyse de la fluorescence émise par l'IP a été effectuée par cytométrie en flux indiquant que la perméabilité membranaire augmente avec les concentrations du traitement, ainsi que le pourcentage des cellules IP-positives (cellules dont la membrane plasmique est altérée) traitées par le RSV est supérieur à celui des cellules traitées par les AZA-STs. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et les véhicules utilisés.



**Figure 48:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la perméabilité de la membrane plasmique.

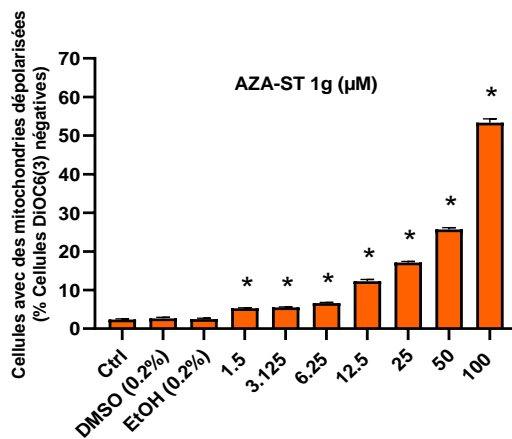
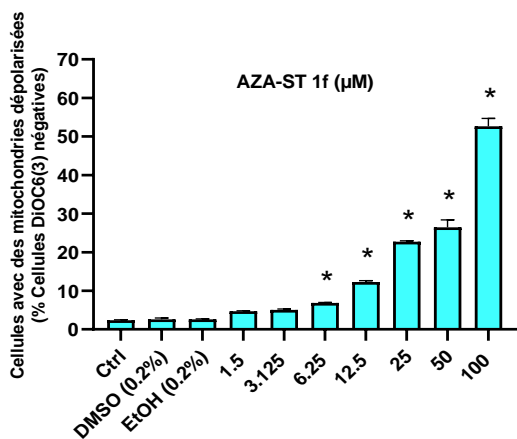
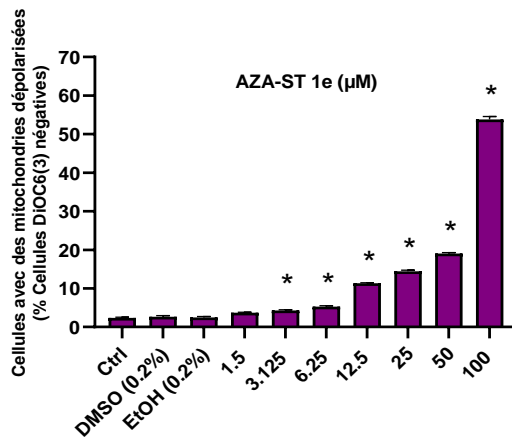
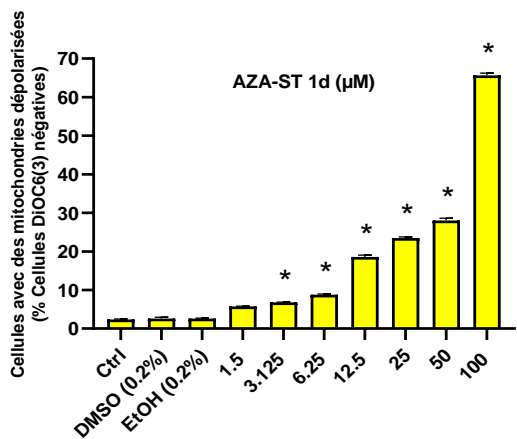
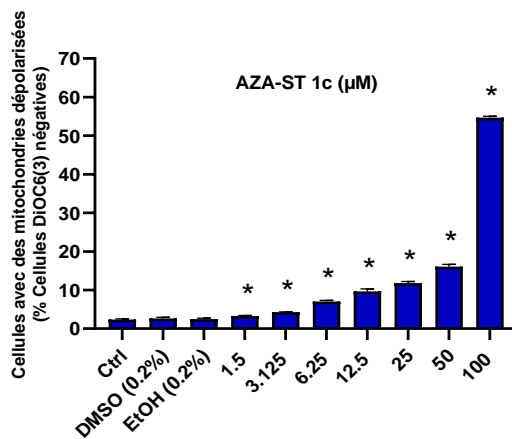
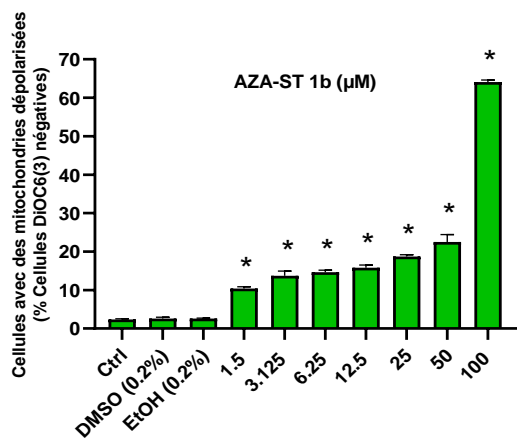
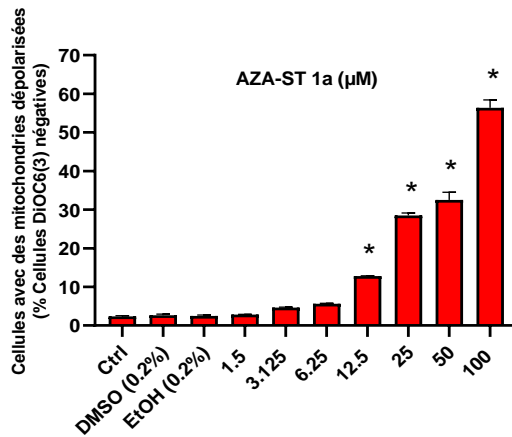
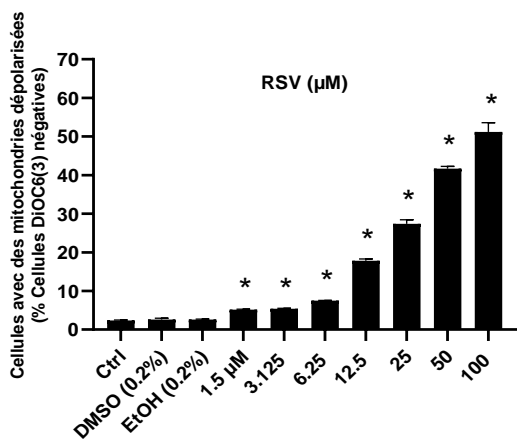
*Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a–g et du RSV sur les dommages de la membrane plasmique et la viabilité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium (IP). Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans AZA-ST 1a–g ou resvératrol (trans resvératrol) à des concentrations encadrant les IC50 (6,25, 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées.*

#### **4. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial : évaluation par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3)**

Le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) est la différence du potentiel électrique à travers la membrane interne mitochondriale. Cette différence est générée par le pompage des protons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale produisant un gradient chimique ( $\Delta$ pH) et un gradient électrochimique négatif ( $\Delta\Psi_m$ ). Ce dernier est crucial pour le maintien de la fonction de la mitochondrie, principalement la production d'ATP, et pour le contrôle et la régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale.

Afin de caractériser la perturbation de l'activité métabolique mitochondriale, il est donc primordial de mesurer le potentiel transmembranaire mitochondrial par le DiOC<sub>6</sub>(3) qui est un fluorochrome qui s'accumule au niveau de la mitochondrie en fonction du potentiel. Cette accumulation du DiOC<sub>6</sub>(3) est dépendante de la valeur du potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) ; c'est-à-dire, la diminution de la fluorescence de ce fluorochrome reflète la diminution du  $\Delta\Psi_m$ .

Après avoir traité les cellules N2a pendant 48h par les AZA-STs et le RSV avec une gamme de concentrations de 1,5  $\mu$ M à 100  $\mu$ M, on constate que le RSV et ses analogues déclenchent des dysfonctionnements mitochondriaux de manière concentration-dépendante associée à une perte plus ou moins prononcée du  $\Delta\Psi_m$  avec les différents AZA-STs à partir d'une concentration de l'ordre de 12,5  $\mu$ M. Les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées par les différents véhicules (EtOH 0,2 %, DMSO 0,2 %) ne présentent aucune différence significative du pourcentage des cellules DiOC<sub>6</sub>(3) négatives (cellules ayant des mitochondries dépolarisées) (**Figure 49**).





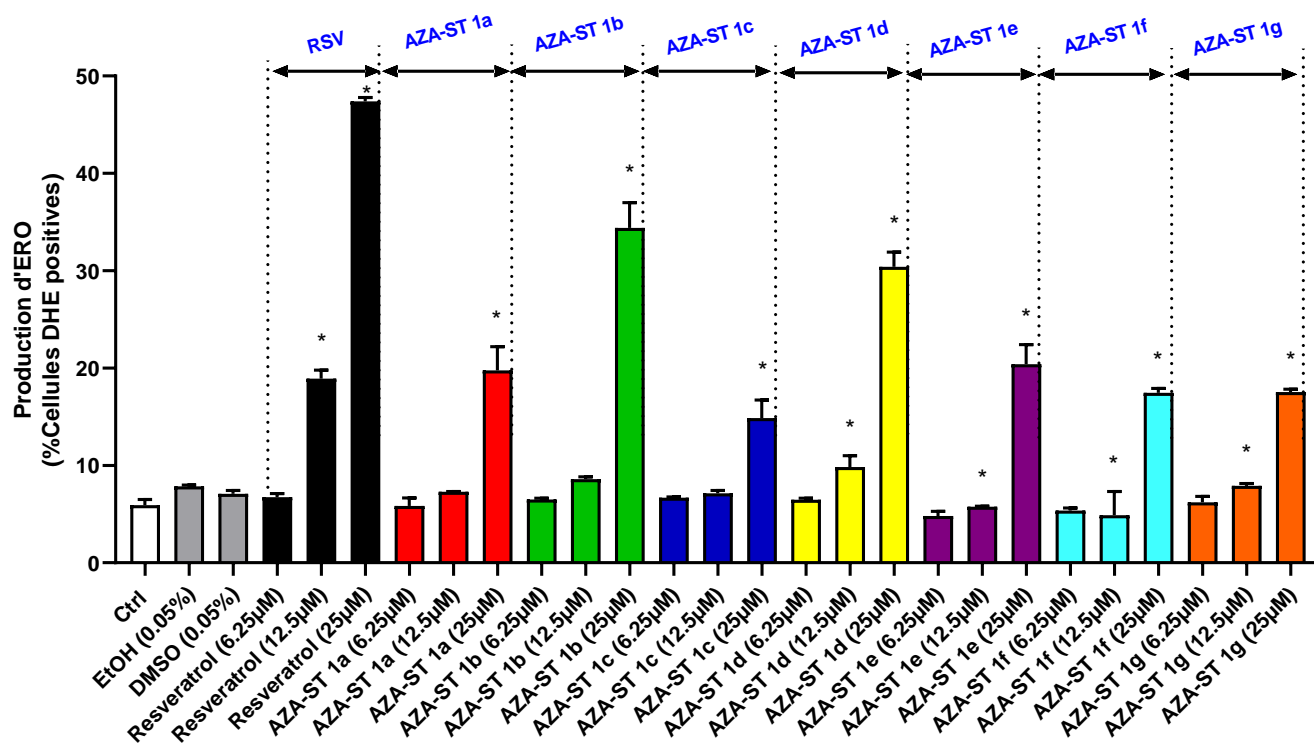
**Figure 49:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). *Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a–g et du RSV sur le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3). Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans AZA-ST 1a–g ou resvératrol (trans resvératrol) à des concentrations dans la plage des IC<sub>50</sub> (6,25, 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$ SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées.*

### 5. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) : évaluation par coloration au dihydroéthidium

La coloration au dihydroéthidium (DHE) a été utilisée pour la mesure de la production d'espèces réactives d'oxygènes (ERO), en particulier les anions superoxydes ( $O_2^{\bullet -}$ ), sur les cellules N2a.

Il est bien établi que le stress oxydatif peut être associé à la mort cellulaire et peut également induire des dommages cellulaires dans certaines molécules (lipides, protéines et ADN) (Nury, et al., 2021). Par conséquent, la capacité des AZA-STs 1a–g et du RSV à déclencher une surproduction d'ERO sur des cellules entières au niveau mitochondrial a été évaluée sur des cellules N2a. À trois concentrations encadrant les IC<sub>50</sub> (6,25, 12,5 et 25  $\mu$ M), une surproduction d'ERO a été détectée sur ces cellules traitées par les différents AZA-STs 1a–g et RSV pendant 48h. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 50**.

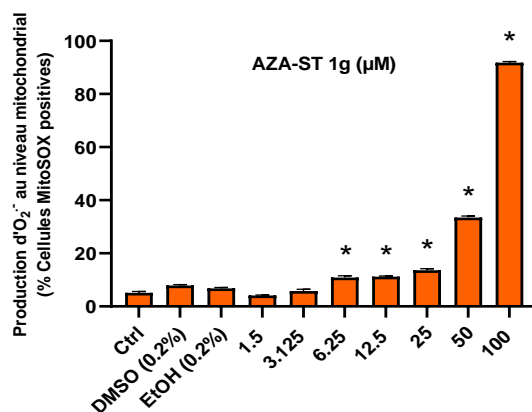
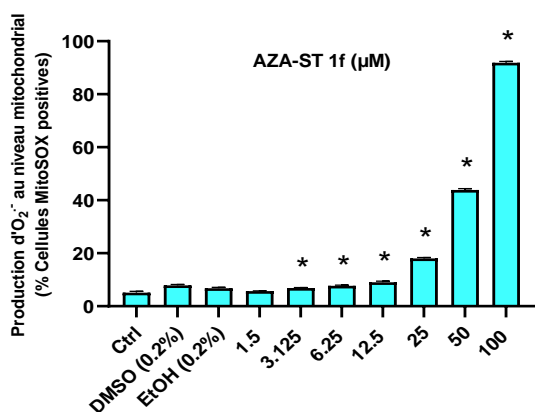
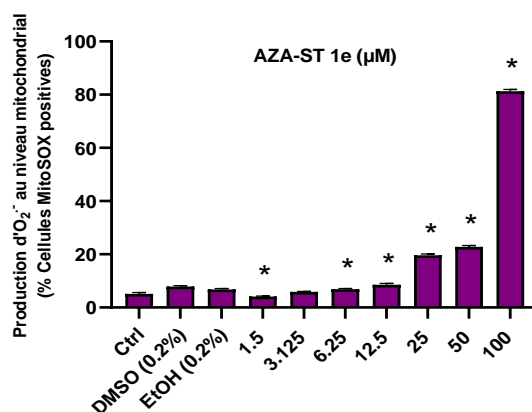
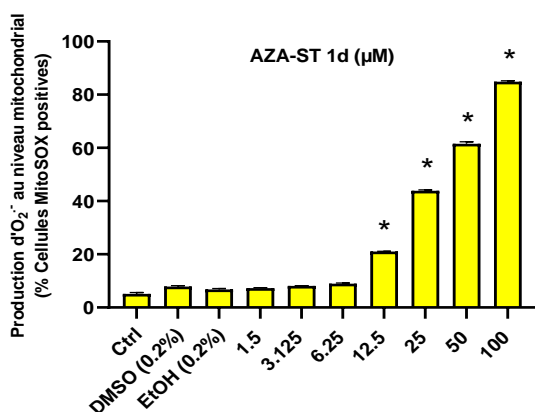
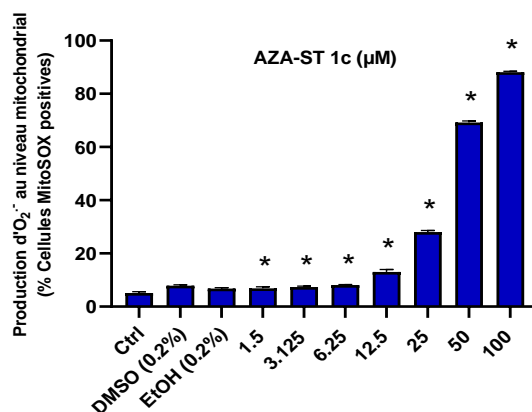
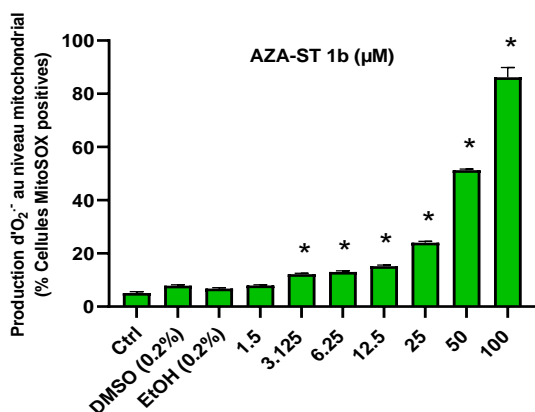
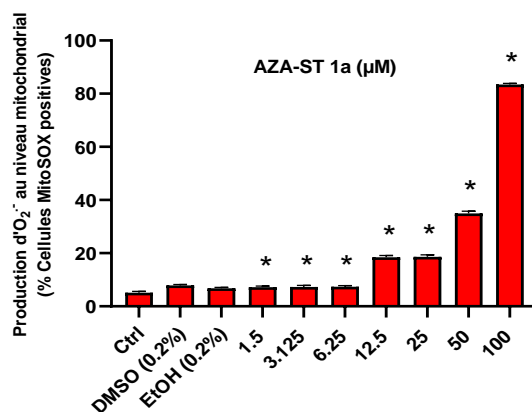
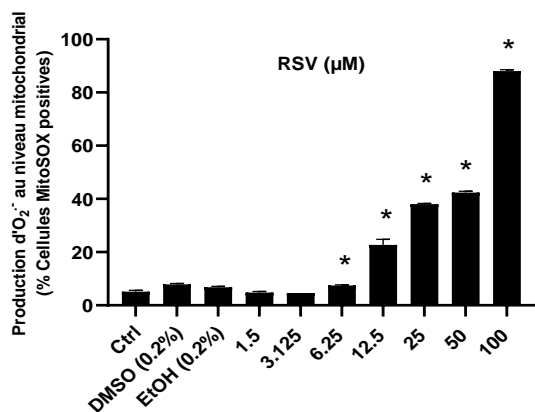
L'analyse par cytométrie en flux de la fluorescence émise par le DHE a révélé que les pourcentages les plus élevés de cellules affectées par la surproduction d'ERO, identifiées par coloration au dihydroéthidium (cellules DHE positives), ont été observés dans l'ordre suivant : RSV > AZA-ST 1b > AZA-ST 1d > AZA-ST 1a–e > AZA-ST 1f–g > AZA-ST 1c. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.



**Figure 50:** Effets du trans-resvératrol et des AZA-STs (1a-1g) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a-g et du RSV sur la production d'ERO par coloration au dihydroéthidium (DHE). Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans AZA-ST 1a-g ou resvératrol (trans resvératrol) à des concentrations dans la plage des IC50 (6,25, 12,5 et 25 μM). Les données sont la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées.

## 6. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) au niveau mitochondrial : évaluation par coloration au MitoSOX Red

La quantification d'ERO incluant la production d'anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) a été réalisée par la coloration au MitoSOX Red dans une gamme de concentrations d'AZA-STs de 1,5 μM à 100 μM (Figure 51).



**Figure 51:** Mesure de la production d'ERO incluant l'anion superoxyde au niveau mitochondrial sur des cellules cultivées en présence de RSV et AZA-STs (1a-1g). *Evaluation par cytométrie en flux des effets des AZA-STs 1a–g et du RSV sur la production d'ERO et  $O_2^{\bullet-}$  par coloration au MitoSOX Red. Les cellules N2a ont été incubées pendant 48 h avec ou sans AZA-ST 1a–g ou RSV (trans-resvératrol) à des concentrations de 1,5 à 100  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$ SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées.*

L'analyse par cytométrie en flux a montré une augmentation du pourcentage des cellules MitoSOX-positives (cellules présentant une surproduction d'ERO et  $O_2^{\bullet-}$  au niveau mitochondrial). Cette augmentation, significative, dépendante de la concentration, a été observée à la fois avec les différents AZA-STs et le RSV. Aucune différence significative n'a été détectée entre les cellules non traitées (contrôle) et les véhicules utilisés.

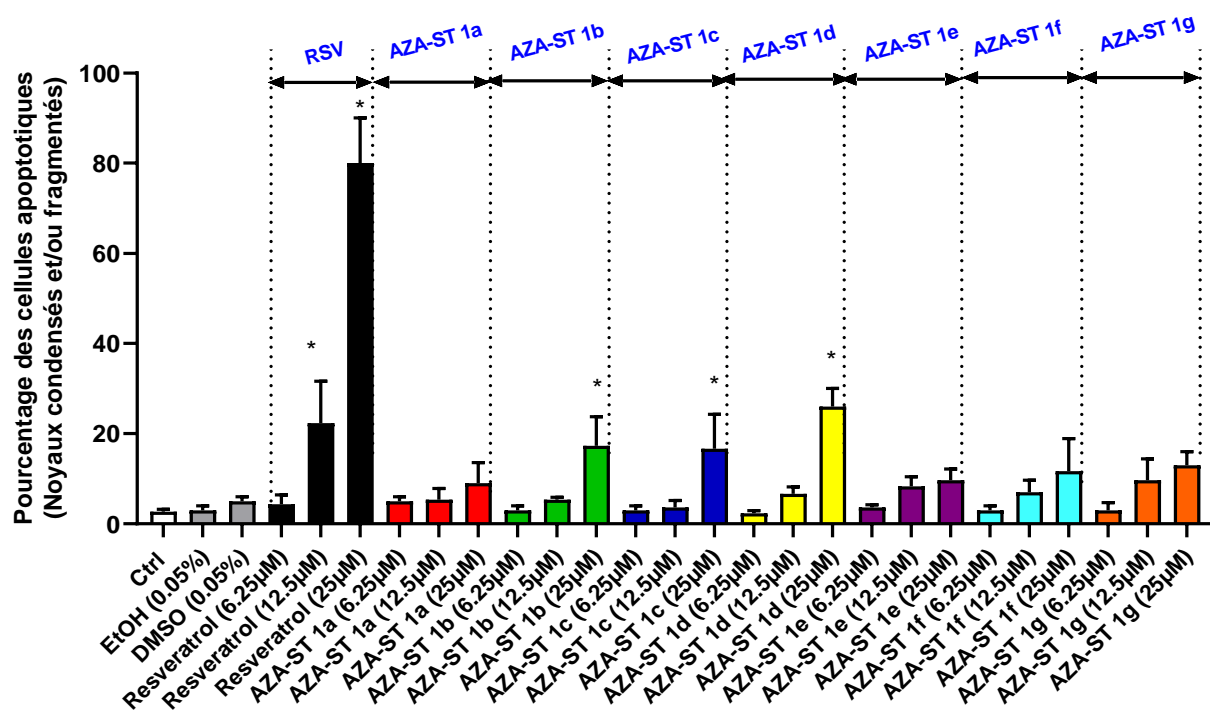
## 7. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur l'induction d'apoptose :

### Caractérisation de la morphologie nucléaire après coloration au Hoechst 33342

Le RSV est connu par sa capacité d'induction de la mort cellulaire par apoptose dans plusieurs types de cellules quand il est utilisé à forte concentrations (à partir de 40  $\mu$ M), et peut également déclencher des voies alternatives entraînant d'autres types de mort telles que celles contribuant à l'autophagie ou à la catastrophe mitotique (Delmas et al., 2011).

Afin de déterminer si les dérivés du RSV (AZA-ST 1a-1g) peuvent ou non induire le même type de mort cellulaire que le RSV sur cellules N2a, la microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 a été utilisée, ce qui permet d'identifier facilement la morphologie de cellules apoptotiques ayant des noyaux condensés et/ou fragmentés (Majno & Joris, 1995; Lizard et al., 1995).

Pour cela, les cellules N2a ont été traitées pendant 48h par le RSV et les AZA-STs (1a-1g) aux concentrations encadrant les IC 50 (6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M).



**Figure 52:** Quantification des cellules apoptotiques par microscopie à fluorescence après coloration au Hoechst 33342 : Effets des AZA-STs et du RSV sur l'induction d'apoptose. Les cellules *N2a* ont été traitées pendant 48h avec ou sans AZA-ST 1a–g ou resvératrol (*trans-resvératrol*) à des concentrations comprises entre les  $IC_{50}$  (6,25, 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La significativité des données comparées a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Véhicules (*Ethanol (EtOH)* pour RSV ; *DMSO* pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : *EtOH* (0,05 %) et *DMSO* (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées.

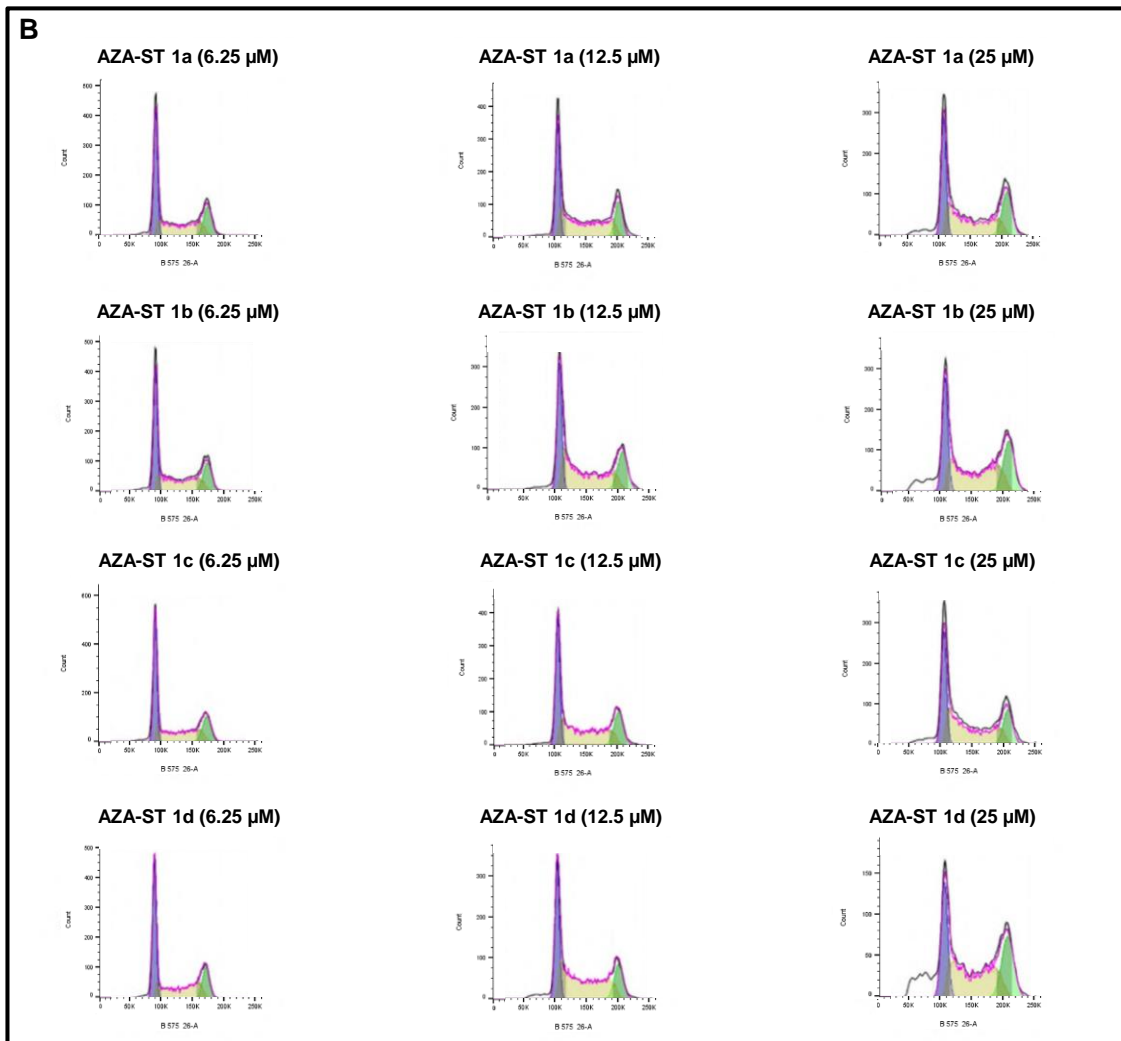
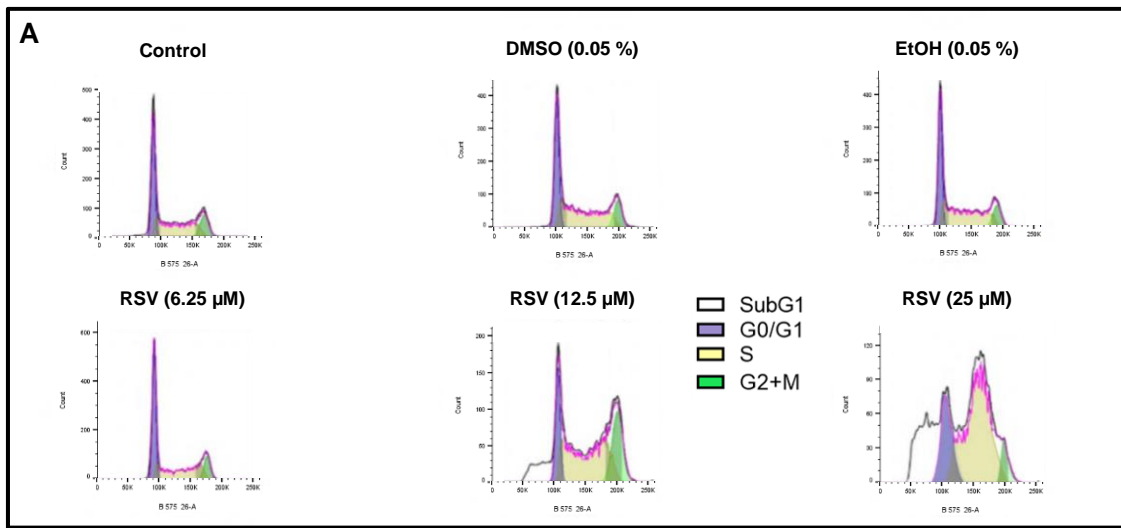
D'après les résultats obtenus présentés dans la **Figure 52**, on constate que le RSV est la seule molécule qui induit fortement une mort cellulaire par apoptose définie par une augmentation accrue du pourcentage de cellules à noyaux condensés et/ou fragmentés (caractéristiques de cellules apoptotiques) de l'ordre de  $22 \pm 9$  % et de  $80 \pm 10$  % respectivement à 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M. Par ailleurs, une légère et significative augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques a été révélée avec AZA-ST 1b (25  $\mu$ M :  $17 \pm 1$  %) et AZA-ST 1d (25  $\mu$ M :  $26 \pm 4$ ), alors que des élévations légères mais non significatives ont été constatées avec les autres AZA-STs (AZA-STs 1a, 1c, 1e, 1f et 1g).

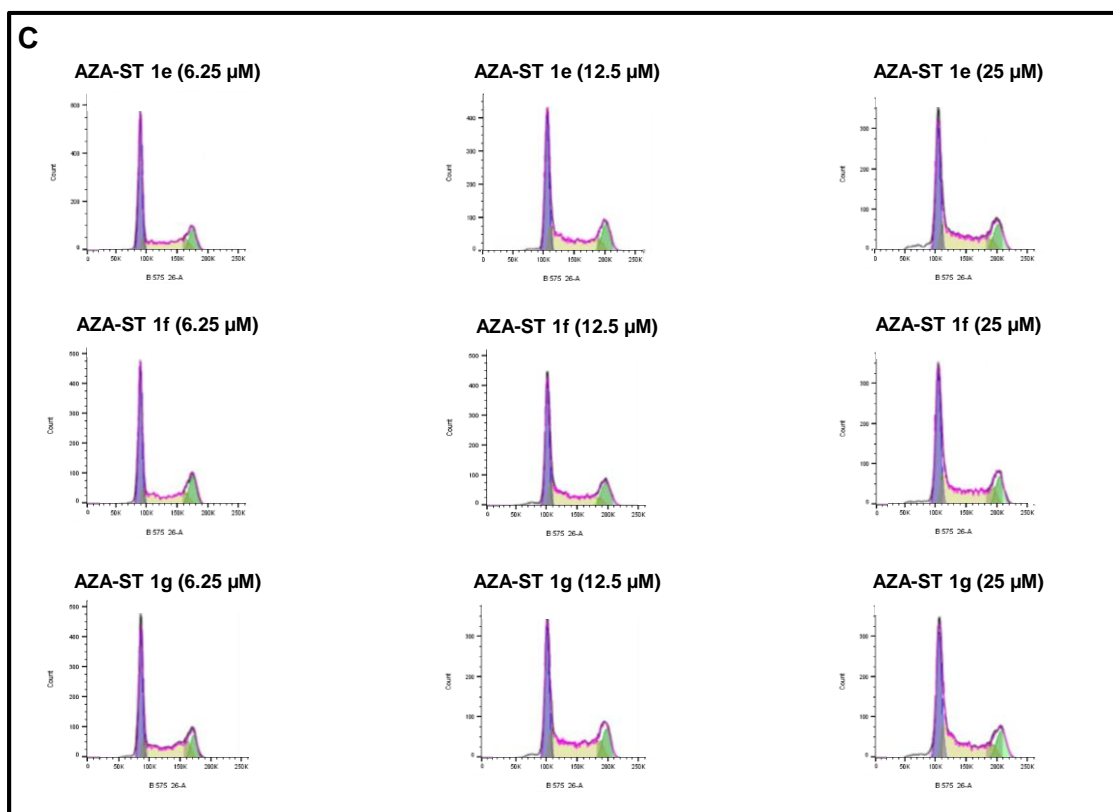
## 8. Effet des AZA-STs et du trans-resvératrol sur le cycle cellulaire : analyse par cytométrie en flux

Des travaux antérieurs ont prouvé que le RSV est un inducteur de mort cellulaire par apoptose conduisant à une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire (Marel et al., 2008; Colin et al., 2009). Il s'est aussi avéré que l'apoptose peut, dans certains cas, être associée à une population de cellules en SubG1 résultant de la fragmentation inter-nucléosomal de l'ADN.

Suite au traitement des cellules N2a par les différentes molécules étudiées aux concentrations encadrant l'IC50 (6,25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M et 25  $\mu$ M) pendant 48h, la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire a été quantifiée par cytométrie en flux après coloration à l'IP (Ormerod et al., 1992; Fournel et al., 1995). La mesure des phases du cycle cellulaire a deux principaux objectifs : le premier consiste à définir le pourcentage des cellules réparties dans les différentes phases du cycle ; le deuxième objectif permet de déterminer la présence ou l'absence d'un pic SubG1 (qui est un critère d'apoptose) localisé juste avant le pic G0/G1.

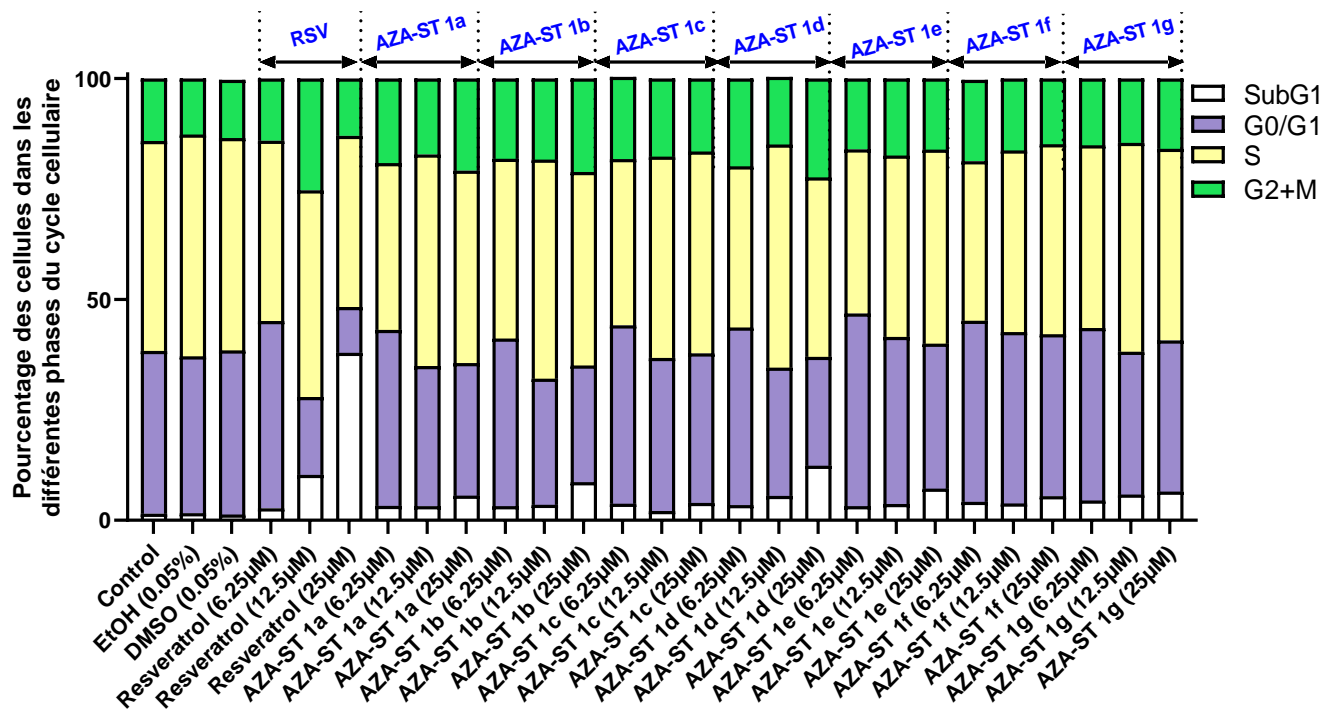
D'après les résultats obtenus et présentés dans les **Figures 53** et **54** et dans le **Tableau 5**, le RSV induit des modifications importantes de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire associées à une forte augmentation des cellules en phase S et une apparition d'un pic SubG1 (25  $\mu$ M :  $38,2 \pm 2,2$  %) confortant l'induction d'apoptose ce qui est en accord avec des études antérieures (Marel et al., 2008; Colin et al., 2009). Avec les AZA-STs, les changements les plus significatifs ont été observés avec AZA-ST 1b (25  $\mu$ M :  $8,9 \pm 1$ %) et AZA-ST 1d (25  $\mu$ M :  $12,9 \pm 1,3$  %) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle :  $1,3 \pm 0,1$  %) où le pic SubG1 conforte l'induction en partie d'une mort apoptotique (**Tableau 5**), ce qui est en accord avec la présence des noyaux condensés et/ou fragmentés observés par coloration au Hoechst 33342 (2  $\mu$ g/mL). Avec les autres aza-stilbènes (1a, 1c, 1e, 1f et 1g), des modifications mineures ont été remarquées.





**Figure 53:** Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire : Effets des aza-stilbènes et du trans-resvératrol sur le cycle cellulaire. Les cellules neuronales murines N2a ont été incubées avec les AZA-STs (1a-1g) ou avec le trans-resvératrol (RSV) pendant 48h à des concentrations dans la gamme des IC50. (A) : Contrôle, Véhicules (EtOH 0,05%, DMSO 0,05%) et RSV ; (B) : AZA-STs (1a-1d) ; (C) : AZA-STs (1e-1g). Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées. Représentation graphique : SubG1 (Blanc) ; Phase G0/G1 (Violet) ; Phase S (Jaune) ; Phase G2+M (Vert).





**Figure 54:** Evaluation de l'effet des AZA-STs et du RSV sur la répartition des cellules en SubG1 et dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M). Les cellules neuronales murines N2a ont été traitées avec les AZA-STs (1a-1g) ou avec le trans-resvératrol (RSV) pendant 48h à des concentrations dans la gamme des IC50 (6,25 µM, 12,5 µM et 25 µM). Véhicules (Ethanol (EtOH) pour RSV ; DMSO pour AZA-ST) (Ksila et al., 2022) : EtOH (0,05 %) et DMSO (0,05 %). Seules les concentrations les plus élevées de véhicules ont été analysées. Représentation graphique : SubG1 (Blanc) ; Phase G0/G1 (Violet) ; Phase S (Jaune) ; Phase G2+M (Vert).

**Tableau 5:** Répartition des cellules N2a dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M) et quantification des cellules en SubG1 après traitement par les aza-stilbènes ou par le *trans*-resvératrol.

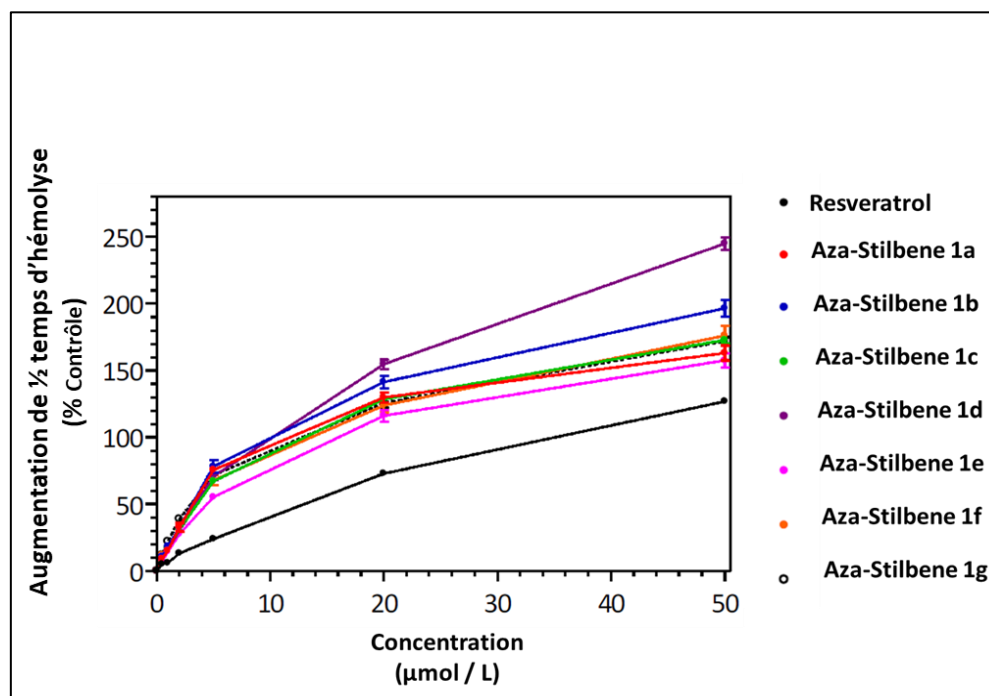
	Cell cycle phases			
	SubG1	G0/G1	S	G2+M
Control	1.3±0.1	37.2±0.8	47.5±1.3	14.0±1.2
EtOH (0.05%)	1.7±0.1	35.6±0.7	50.2±0.1	12.5±0.8
DMSO (0.05%)	1.2±0.1	37.6±1.0	48.0±0.7	13.2±0.6
Resveratrol (6.25 µM)	2.6±0.2	42.4±0.2 *	40.5±0.3 *	14.3±0.2
Resveratrol (12.5 µM)	10.5±1.0 *	17.4±1.5 *	46.8±1.0	25.3±1.8 *
Resveratrol (25 µM)	38.2±2.2 *	10.4±2.0 *	38.4±4.0 *	13.0±2.0
AZA-ST 1a (6.25 µM)	3.3±0.1	39.7±0.5 *	37.7±0.9 *	19.3±0.5 *
AZA-ST 1a (12.5 µM)	3.8±0.4	31.0±1.3 *	47.9±0.5	17.3±1.2 *
AZA-ST 1a (25 µM)	5.9±0.4 *	30.0±1.5 *	43.6±1.1 *	20.5±1.0 *
AZA-ST 1b (6.25 µM)	3.3±0.1	38.3±1.0	40.5±1.2 *	17.9±1.6 *
AZA-ST 1b (12.5 µM)	5.0±0.2	28.2±1.8 *	49±2.7	17.5±1.1 *
AZA-ST 1b (25 µM)	8.9±1.0 *	26.7±0.6 *	44.8±2.0 *	19.6±2.5 *
AZA-ST 1c (6.25 µM)	3.7±0.6	40.7±0.4 *	37.6±0.9 *	18.0±0.9 *
AZA-ST 1c (12.5 µM)	3.4±0.6	34.0±1.0	45.3±0.4	17.3±1.0 *
AZA-ST 1c (25 µM)	5.0±1.6	33.5±2.4 *	45.3±1.1	16.2±0.8
AZA-ST 1d (6.25 µM)	3.4±0.3	40.2±1.6 *	36.5±1.0 *	19.9±2.4 *
AZA-ST 1d (12.5 µM)	5.0±0.7	30.0±0.7 *	50.0±0.8 *	15.0±0.1
AZA-ST 1d (25 µM)	12.9±1.3 *	24.2±1.1 *	40.6±0.8 *	22.3±0.7 *
AZA-ST 1e (6.25 µM)	3.2±0.3	43.6±2.0 *	37.3±1.6 *	15.9±1.0
AZA-ST 1e (12.5 µM)	4.0±0.5	37.8±0.5	41.0±1.0 *	17.2±1.8 *
AZA-ST 1e (25 µM)	7.3±1.1 *	32.8±0.6 *	44.0±1.2 *	15.9±0.6
AZA-ST 1f (6.25 µM)	4.1±0.1 *	41.1±0.2 *	36.6±1.4 *	18.2±1.1 *
AZA-ST 1f (12.5 µM)	5.2±0.7	38.7±0.5	40.8±1.4 *	15.3±1.4
AZA-ST 1f (25 µM)	6.4±0.2 *	36.5±0.5	42.7±1.3 *	14.4±1.6
AZA-ST 1g (6.25 µM)	4.5±0.5	39.0±1.1	41.3±2.9 *	15.2±2.7
AZA-ST 1g (12.5 µM)	5.5±0.3 *	32.3±0.4 *	47.5±0.7	14.5±0.7
AZA-ST 1g (25 µM)	7.2±0.5 *	34.0±1.0	43.0±0.4 *	15.8±1.0

## 9. Evaluation des activités antioxydantes des AZA-STs et du *trans*-resvératrol

Les activités antioxydantes des AZA-STs et du RSV ont été évaluées par différentes techniques complémentaires : test KRL, test DPPH, test de la réduction de Fer (FRAP) et test PAOT. Les résultats sont illustrés dans le **Tableau 6**.

Le RSV étant également connu pour ses capacités antioxydantes, les propriétés antioxydantes des AZA-STs ont été déterminées par le test KRL et comparées au RSV. D'après les résultats présentés dans la **Figure 55**, tous les AZA-STs montrent des activités antioxydantes supérieures à celles du RSV. Les activités antioxydantes les plus élevées ont été observées avec les AZA-

STs 1b ( $42,65 \pm 0,78$ ) et 1d ( $56,49 \pm 0,59$ ). Les AZA-STs 1a, 1c, 1e, 1f et 1g présentent des statuts antioxydants KRL similaires ou inférieurs.



**Figure 55:** Quantification de l'activité antioxydante du RSV et des AZA-STs par test KRL

Les résultats obtenus à partir du test KRL, intégrant à la fois la capacité d'une molécule antioxydante à neutraliser les ERO et à prévenir la peroxydation lipidique, ont été associés à deux dosages antioxydants complémentaires : le test DPPH et FRAP.

A partir des valeurs d'IC<sub>50</sub> du test DPPH qui ne prennent en considération que la capacité d'une molécule antioxydante à neutraliser un radical, on constate que les AZA-STs possèdent des activités radicalaires plus importantes, comme observé avec le test KRL, comparativement au RSV ( $32,76 \pm 6,40$ ), sauf exception les AZA-STs 1c ( $5,51 \pm 2,25$ ) et 1g ( $17,23 \pm 0,85$ ) ayant des activités plus faibles (**Tableau 6**).

Les polyphénols étant aussi connus par leurs capacités chélatrices vis-à-vis plusieurs de métaux, principalement le Fer (**Lakey-Beitia et al., 2021**) le test FRAP a été utilisé ; il montre des activités chélatrices quasiment identiques observées avec toutes les molécules testées (**Tableau 6**).

Par comparaison aux tests DPPH et KRL, le test PAOT se base sur la quantification des activités de piégeage des antioxydants à l'aide d'une méthode électrochimique. D'après les résultats présentés dans le **Tableau 6**, les AZA-STs 1a ( $34,11 \pm 0,18$ ) et 1d ( $56,49 \pm 0,59$ ) ont les caractéristiques antioxydantes les plus élevées, tandis que l'AZA-ST 1c est l'antioxydant le plus faible ( $13,34 \pm 0,54$ ).

Il est important de souligner les différences d'un test antioxydant à un autre en raison des différents paramètres pris en compte pour évaluer les activités antioxydantes.

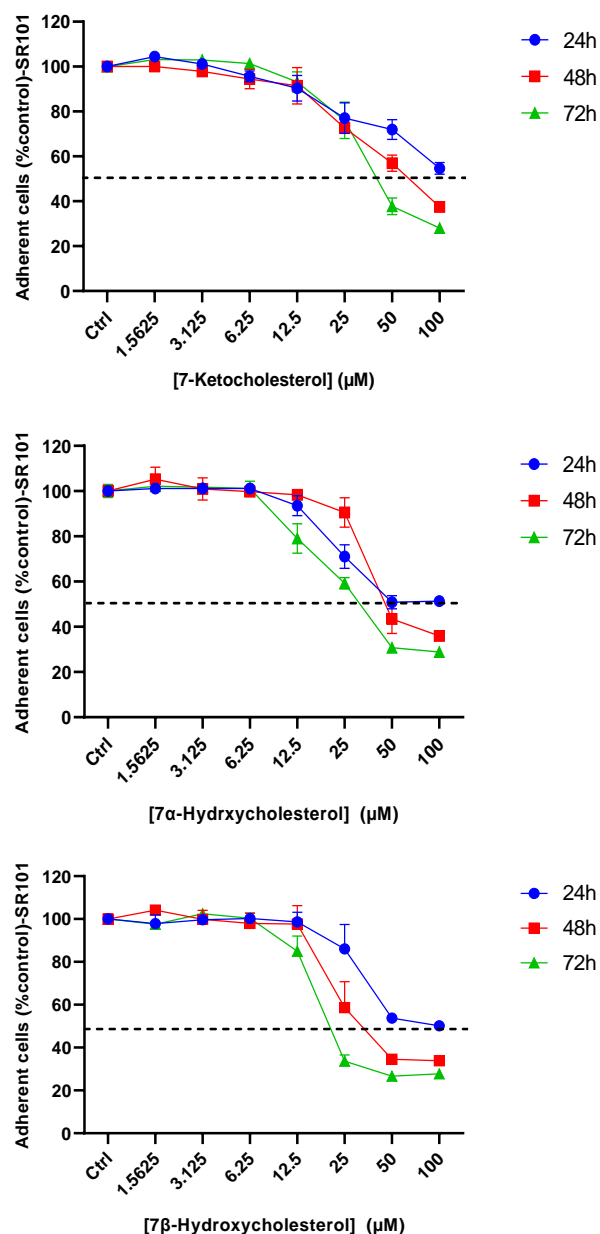
**Tableau 6:** Evaluation des activités antioxydantes de RSV et des AZA-STs par différents tests (KRL, DPPH, FRAP et PAOT). Les molécules étudiées ont été utilisées à  $20 \mu\text{M}$  (KRL) et à  $25 \mu\text{M}$  (DPPH, FRAP, PAOT). Le test KRL est exprimé en tant qu'augmentation d'hémolyse (% du contrôle) ; le test DPPH est exprimé en % d'inhibition ; le dosage FRAP est exprimé en  $\mu\text{Mol Fe}^{2+}/\text{mM}$  de RSV et d'AZA-STs et le test PAOT est exprimé en score PAOT/Litre de l'échantillon analysé. Les données montrées sont sous forme de moyenne  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes effectuées en triplicat ; ND : Non Déterminé.

	<b>KRL</b> (20 $\mu\text{M}$ )	<b>DPPH</b> (25 $\mu\text{M}$ )	<b>FRAP</b> (25 $\mu\text{M}$ )	<b>PAOT</b> (25 $\mu\text{M}$ )
<b>RSV</b>	$72,81 \pm 1,10$	$32,76 \pm 6,40$	$10,41 \pm 0,05$	$19,39 \pm 1,06$
<b>AZA-ST 1a</b>	$129,74 \pm 3,92$	$35,07 \pm 1,75$	$10,52 \pm 0,05$	$34,11 \pm 0,18$
<b>AZA-ST 1b</b>	$141,29 \pm 4,65$	$38,84 \pm 1,90$	$10,02 \pm 0,04$	$42,65 \pm 0,78$
<b>AZA-ST 1c</b>	$128,38 \pm 2,03$	$5,51 \pm 2,25$	$12,32 \pm 0,06$	$13,34 \pm 0,54$
<b>AZA-ST 1d</b>	$154,63 \pm 3,50$	$47,84 \pm 2,35$	$11,05 \pm 0,07$	$56,49 \pm 0,59$
<b>AZA-ST 1e</b>	$116,06 \pm 4,40$	$48,55 \pm 2,40$	$10,34 \pm 0,05$	ND
<b>AZA-ST 1f</b>	$123,78 \pm 5,16$	$53,69 \pm 2,65$	$10,41 \pm 0,05$	ND
<b>AZA-ST 1g</b>	$125,76 \pm 3,39$	$17,23 \pm 0,85$	$10,18 \pm 0,04$	ND

## II. Etude de la toxicité d'oxystérols oxydés en C7 (7-cétocholestérol, 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, 7 $\beta$ -hydroxycholestérol) sur cellules N2a

Ce travail a actuellement fait l'objet d'une publication : 1 revue (Annexe 6, Publication 4).

### 1. Détermination des concentrations cytotoxiques des oxystérols oxydés sur le carbone7 (C7)



**Figure 56:** Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur l'adhésion cellulaire. Evaluation par le test Sulforhodamine (SR 101) des effets des oxystérols oxydés en

*C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur l'adhésion cellulaire. Les cellules N2a ont été traitées pendant 24h, 48 h et 72h avec ou sans des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) dans une gamme de concentrations allant de 1,5625 à 100  $\mu$ M. La ligne pointillée noire indique la valeur de la concentration (ou la gamme de concentrations) réduisant la viabilité cellulaire de 50 % (IC<sub>50</sub>). Les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. Une valeur  $p \leq 0.05$ , considérée significative statistiquement, est indiquée par une étoile (\*) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle).*

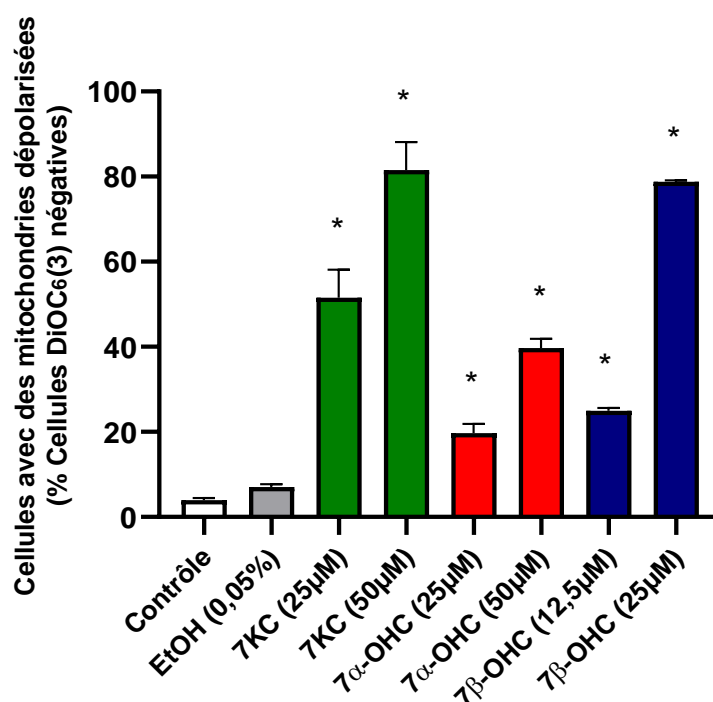
Les effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur l'adhésion cellulaire ont été évalués en utilisant le test SR101. Les cellules N2a ont été traitées pendant 24h, 48h et 72h avec différentes concentrations de 7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC de 1,5625 à 100  $\mu$ M. Les résultats sont présentés dans la **Figure 56**.

Les résultats montrent une diminution dose-dépendante observée avec les trois oxystérols testés pendant 72h avec des IC<sub>50</sub> qui varient d'une molécule à une autre. Sur la base de nos résultats (**Tableau 7**), le 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M), le 7 $\alpha$ -OHC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) et le 7 $\beta$ -OHC (12,5  $\mu$ M ; 25  $\mu$ M) ont été sélectionnés pour caractériser le type de mort qu'ils induisent.

**Tableau 7: Valeurs des IC<sub>50</sub> des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) : utilisation du test SR101**

	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
	24h	48h	72h
<b>7-cétocholestérol</b>	100	50	25<IC <sub>50</sub> <50
<b>7<math>\alpha</math>-hydroxycholestérol</b>	50	50	25<IC <sub>50</sub> <50
<b>7<math>\beta</math>-hydroxycholestérol</b>	50	25<IC <sub>50</sub> <50	12,5<IC <sub>50</sub> <25

## 2. Effet des oxystérols sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) : évaluation par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3)



**Figure 57:** Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Evaluation par cytométrie en flux des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur  $\Delta\Psi_m$  après coloration au DiOC<sub>6</sub>(3). Les cellules N2a ont été incubées pendant 72h avec ou des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) à des concentrations incluant les IC50 (7KC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\alpha$ -OHC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\beta$ -OHC : 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif

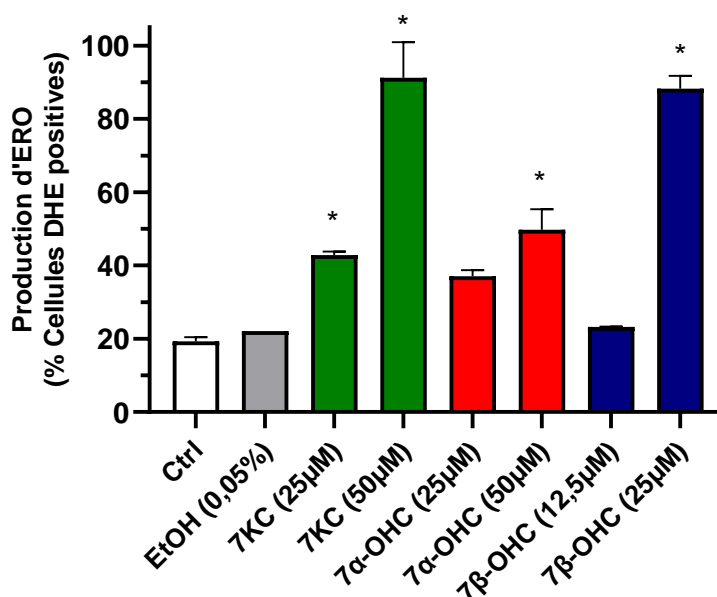
Suite au traitement des cellules N2a avec le 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M), le 7 $\alpha$ -OHC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) et le 7 $\beta$ -OHC (12,5  $\mu$ M ; 25  $\mu$ M) pendant 72h, une diminution marquée de  $\Delta\Psi_m$ , révélée par une augmentation du pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées (cellules DiOC<sub>6</sub>(3) négatives), est observée comparativement aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH 0,05%). D'après la **Figure 57**, le 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) et le 7 $\beta$ -OHC (25  $\mu$ M) induisent une augmentation significative du pourcentage de cellules DiOC<sub>6</sub>(3) négatives, alors qu'on observe un pourcentage faible avec le 7 $\alpha$ -OHC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M). Aucune différence

significative du pourcentage des cellules avec des mitochondries dépolarisées n'a été observée avec les cellules non traitées et le véhicule (EtOH 0,05%).

### 3. Caractérisation de l'oxyapoptophagie (« oxiaoptophagy »)

L'oxyapoptophagie a été initialement décrite en 2003 (Monier et al., 2003). Il s'agit s'un type de mort cellulaire associant à la fois des critères de stress OXYdant, d'APOPTOse et d'autoPHAGIE (Nury, et al., 2021). L'oxyapoptophagie a jusqu'à présent été caractérisée à des temps précoces (24 et 48h) mais jamais pour des traitements de 72h.

#### 3.1 Quantification du stress oxydant : mesure de la surproduction des espèces réactives de l'oxygène par cytométrie en flux après coloration à la dihydroéthidine



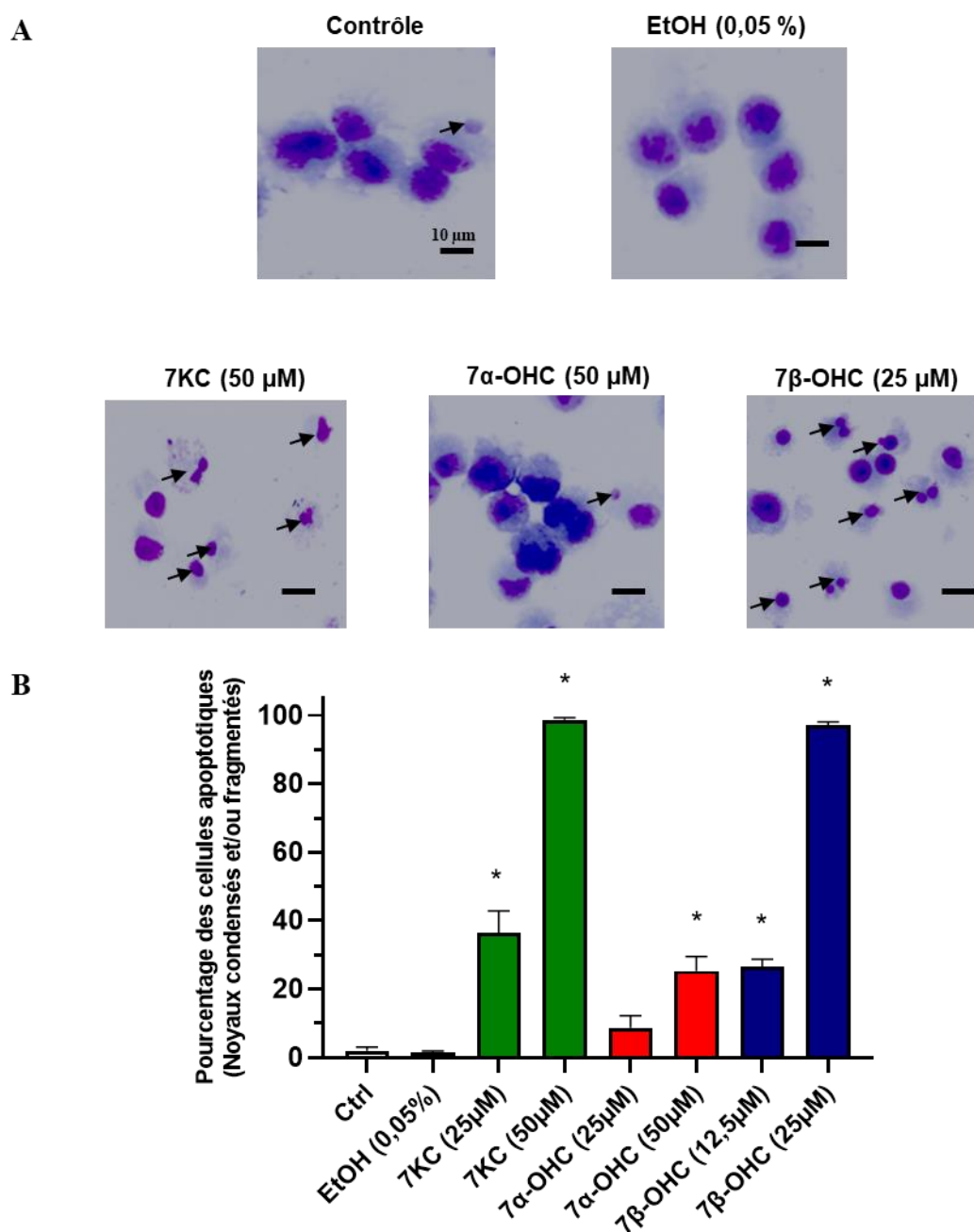
**Figure 58:** Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7α-OHC et 7β-OHC) sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Evaluation par cytométrie en flux des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7α-OHC et 7β-OHC) sur la production d'ERO par coloration avec la dihydroéthidine (DHE). Les cellules N2a ont été incubées pendant 72h avec ou sans oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7α-OHC et 7β-OHC) à des concentrations incluant les IC50 (7KC : 25 et 50 µM ; 7α-OHC : 25 et 50 µM ; 7β-OHC : 12,5 et 25 µM). Les données sont la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.



Le traitement des cellules N2a avec du 7KC (25 $\mu$ M ; 50 $\mu$ M), du 7 $\alpha$ -OHC (25 $\mu$ M ; 50 $\mu$ M) et du 7 $\beta$ -OHC (12,5  $\mu$ M ; 25  $\mu$ M) pendant 72h conduit à une élévation importante du pourcentage des cellules DHE positives (surproduisant des ERO) avec le 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) et le 7 $\beta$ -OHC (12,5  $\mu$ M ; 25  $\mu$ M). La production d'ERO est faible avec les cellules traitées par le 7 $\alpha$ -OHC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M). Aucune différence significative du pourcentage de cellules produisant des ERO a été révélée entre les cellules non traitées et le véhicule (EtOH 0,05%) (**Figure 58**).

### **3.2 Caractérisation de la mort cellulaire : analyse de l'apoptose par coloration au May-Grünwald-Giemsa et mesure de l'activation des caspases 3/7 par cytométrie en flux par la technique FLICA (Fluorescent Inhibitor of Caspases)**

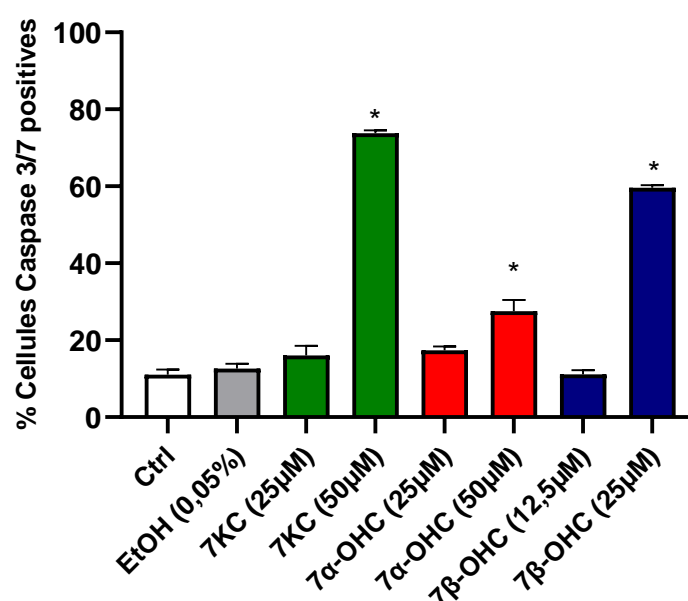
D'après les résultats obtenus présentés dans la **Figure 59**, on observe que le pourcentage de cellules à noyaux condensés et/ou fragmentés (caractéristiques de cellules apoptotiques) est fortement augmentés avec les cellules traitées par le 7KC (50  $\mu$ M) et par le 7 $\beta$ -OHC (25  $\mu$ M) dont les pourcentages des cellules apoptotiques sont de l'ordre de 97,6 % et 96 % respectivement. Par ailleurs, une légère et significative élévation du pourcentage de cellules apoptotiques a été révélée avec 7KC (25  $\mu$ M), 7 $\beta$ -OHC (12,5  $\mu$ M). Avec le 7 $\alpha$ -OHC, on n'observe pas ou peu de cellules apoptotiques. Aucune différence significative du pourcentage de cellules apoptotiques n'a été révélée entre les cellules non traitées (Ctrl : 1,3 %) et le véhicule (EtOH 0,05% : 2 %).



**Figure 59:** Caractérisation de la mort cellulaire par apoptose induite par les oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC). (A) : Microscopie en lumière blanche après coloration au May-Grünwald-Giemsa ; identification des cellules apoptotiques présentant des noyaux condensés et/ou fragmentés (indiquées par des flèches noires) ; (B) : Quantification des cellules apoptotiques par microscopie en lumière blanche après coloration au May-Grünwald-Giemsa. Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur l'induction d'apoptose. Les cellules N2a ont été traitées pendant 72h avec ou sans oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC

et 7 $\beta$ -OHC)) à des concentrations comprises entre les IC<sub>50</sub> (7KC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\alpha$ -OHC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\beta$ -OHC : 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La significativité a été évaluée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

Au cours de l'apoptose induite par les oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC), l'activation des caspases 3/7 a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant la technique FLICA. Après traitement pendant 72h, on constate une augmentation importante et significative du pourcentage de cellules caspase 3/7 positives avec le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC. Le pourcentage de cellules FLICA positives est de 73,75 % avec le 7KC et de 59,6 % avec le 7 $\beta$ -OHC. On n'observe pas de cellules FLICA positives avec le 7 $\alpha$ -OHC. Les valeurs de cellules FLICA positives sont similaires dans les cellules non traitées (Ctrl : 11 %) et le véhicule (EtOH 0,05% : 12,65 %) (Figure 60).

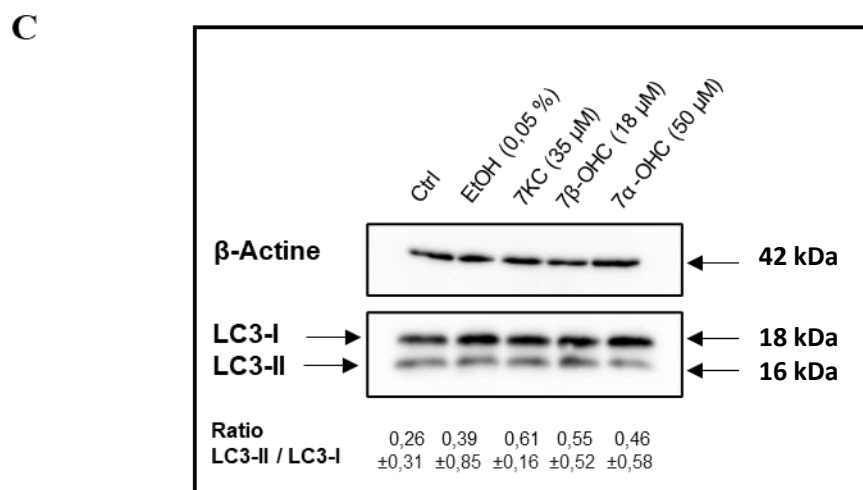
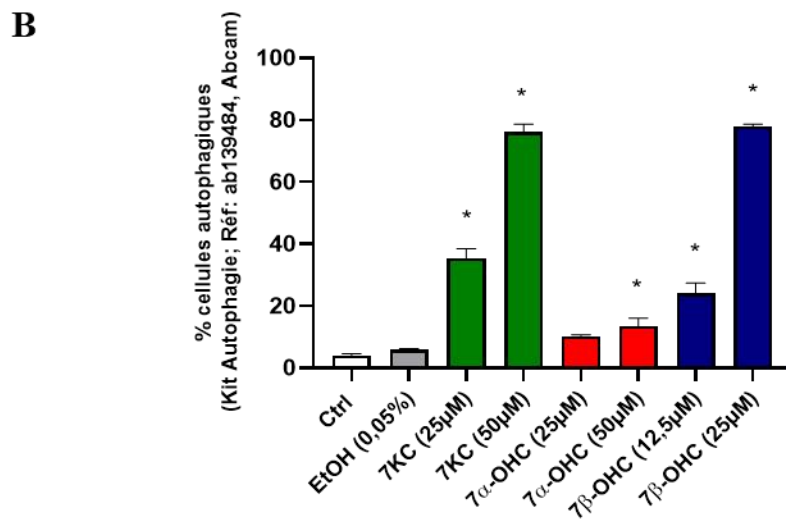
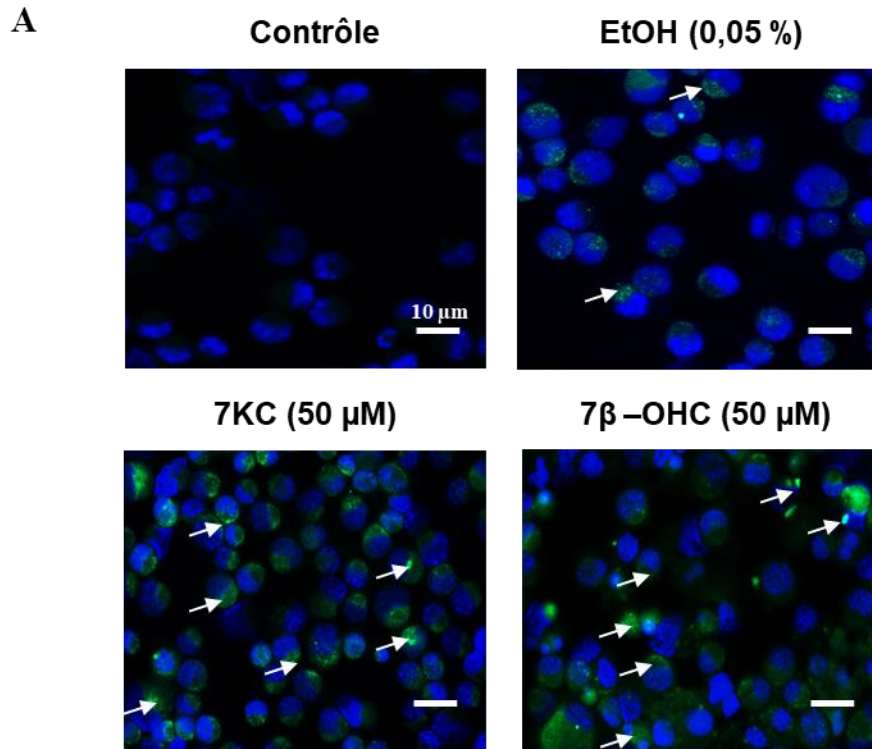


**Figure 60:** Quantification des cellules caspases 3/7 positive par la technique FLICA en cytométrie en flux. Evaluation par cytométrie en flux des effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) sur l'activation des caspases 3/7. Les cellules N2a ont été incubées pendant 72h avec ou sans oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC) à des concentrations incluant les IC<sub>50</sub> (7KC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\alpha$ -OHC : 25 et 50  $\mu$ M ; 7 $\beta$ -OHC : 12,5 et 25  $\mu$ M). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en

*triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.*

### **3.3 Caractérisation de l'autophagie : analyse par microscopie à fluorescence et cytométrie en flux après coloration des vésicules d'autophagie, et analyse par western blot**

Une induction d'autophagie a été observée sur les cellules N2a traitées par le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC après 72h de traitement. Dans ces conditions, des vésicules d'autophagie ont été observées dans les cellules traitées par les oxystérols alors que pas ou peu de vésicules sont présentes dans les cellules contrôle et le véhicule (**Figure 61 A**). Lorsque ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules autophagiques a été déterminé. Les pourcentages varient de 30 à 80% en présence de 7KC et de 7 $\beta$ -OHC ; le pourcentage de cellules autophagiques avec le 7 $\alpha$ -OHC n'excède pas 15%. Dans le contrôle et le véhicule, les pourcentages de cellules autophagiques sont de 5 à 8% (**Figure 61 B**). L'autophagie a été confirmée par western blot ; le rapport LC3II / LC3I est en effet plus élevé en présence 7KC et de 7 $\beta$ -OHC : ceci démontre à nouveau une induction d'autophagie par ces deux oxystérols (**Figure 61 C**). Il est important de noter que les vésicules d'autophagie sont observées dans des cellules n'ayant pas de noyaux condensés / fragmentés (cellules apoptotiques), ce qui démontre que l'autophagie précède l'apoptose dans le processus de mort induit par le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC. Dans les cellules apoptotiques, on observe aussi des vésicules d'autophagie : les vésicules d'autophagie sont observées dans les cellules à noyaux condensés et à noyaux fragmentés (**Figure 61 A**).



**Figure 61:** Analyse de l'autophagie sur cellules N2a traitées par les oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7 $\alpha$ -OHC et 7 $\beta$ -OHC). Différentes méthodes complémentaires ont été utilisées pour caractériser l'autophagie : **(A)** microscopie à fluorescence pour révéler les vésicules d'autophagies (kit autophagie ; Réf : ab 139484 abcam), les cellules autophagies présentent une coloration verte dans le cytoplasme (les flèches blanches indiquent des vésicules d'autophagie) ; **(B)** Quantification par cytométrie en flux des vésicules du pourcentage de cellules avec des vésicules d'autophagie ; **(C)** Analyse par western blot de l'activation de LC3 en LC3I et LC3II. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins trois analyses indépendantes. Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

#### 4. Evaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol et sur la toxicité induite par le 7-cétocholestérol

Les effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade (Promegranate Seed Oil, Cold pressed, paraben & sulfate free, Réf : #10650 ; lot 1-800-544-1925 ; PipingRock, Ronkonkoma, NY, USA) et de l' $\alpha$ -tocophérol (Sigma-Aldrich) n'ont été évalués que sur le 7KC car cet oxystérol est celui qui est souvent le plus augmenté dans les maladies liées à l'âge (Nury et al., 2021).

##### 4.1. Composition en acides gras, phytostérols et tocophérols d'huile de pépins de grenade

###### 4.1.1. Composition en acides gras

Le profil en acides gras de l'huile de pépins de grenade, exprimé en ( $\mu$ g / mg d'huile), a été évalué par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8**. D'après les chromatogrammes, les acides gras majoritaires détectés dans l'huile de pépins de grenade sont les acides palmitique (C16:0), stérique (C18:0), oléique (C18:1 n-9) et linoléique (C18:2 n-6). Les AGIs (acides gras insaturés) sont les plus abondants. Une étude plus approfondie a révélé des formes cis / trans de l'acide linoléique (C18:3) dans l'acide punicique représentant 800  $\mu$ g / mg, ce qui correspond à l'acide gras le plus dominant de l'huile de pépins de grenade (81,33 %).

**Tableau 8:** Composition en acide gras de l'huile de pépins de grenade.

	<b>µg / mg Huile de pépins de grenade</b>
<b>Acides gras saturés</b>	
Acide myristique (C14:0)	0,042 ± 0,17
Acide pentadécylique (C15:0)	0,026 ± 0,00
Acide palmitique (C16:0)	31,532 ± 0,28
Acide heptadécanique (C17:0)	0,260 ± 0,01
Acide stérique (C18:0)	20,166 ± 0,15
Acide nonadécylique (C19:0)	0,097 ± 0,00
Acide arachidonique (C20:0)	3,573 ± 0,06
Acide hénécicosylique (C21:0)	0,249 ± 0,00
Acide béhénique (C22:0)	0,378 ± 0,00
Acide tricosylique (C23:0)	0,105 ± 0,00
Acide lignocérique (C24:0)	0,301 ± 0,00
Acide hyénique (C25:0)	0,242 ± 0,01
Acide cérotique (C26:0)	0,326 ± 0,02
<b>Σ Acides gras saturés</b>	<b>57,297 ± 0,7</b>
<b>Acides gras mono-insaturés</b>	
Acide palmitoléique (C16:1 n-7)	0,334 ± 0,04
Acide hexadé-9-énoïque (C16:1 n-9)	0,072 ± 0,01
Acide vaccénique (C18:1 n-7)	3,811 ± 0,07
Acide oléique (C18:1 n-9)	39,416 ± 2,29
Acide éicosa-7-énoïque (C20:1 n-7)	0,070 ± 0,00
Acide gadoléique (C20:1 n-9)	4,177 ± 0,07
Acide érucique (C22:1)	ND
<b>Σ Acides gras mono-insaturés</b>	<b>47,88 ± 2,48</b>
<b>Acides gras poly-insaturés</b>	
Acide α-linolénique (C18:2 n-6)	76,726 ± 0,81
Acide punicique (C18:3 n-5)	800 ± 0,12
Acide linoléique (C18:2 n-6)	0,509 ± 0,04
Acide eicosadiénoïque (C20:2 n-6)	0,293 ± 0,00
Acide dihomo-γ-linolénique (C20:3 n-6)	0,535 ± 0,02
Acide méadique (C20:3 n-9)	0,129 ± 0,01
Acide arachidonique (C20:4 n-6)	0,205 ± 0,56
<b>Σ Acides gras poly-insaturés</b>	<b>878,397 ± 1,44</b>
<b>Σ Acides gras insaturés</b>	<b>926,277 ± 1,96</b>
<b>Total des acides gras</b>	<b>983,574 ± 1,18</b>

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD

#### 4.1.2. Composition en cholestérol et phytostérols

La composition en cholestérol et en phytostérols de l'huile de pépins de grenade, exprimé en ( $\mu\text{g} / \text{mg}$  d'huile), a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et les résultats sont présentés dans le **Tableau 9**.

Les résultats montrent la présence de 4 phytostérols dans l'huile de pépins de grenade. Le Sitostérol est le phytostérol majoritaire, comme cela est souvent le cas dans les huiles, et il est présent en quantité importante par rapport aux autres phytostérols : Campesterol, Stigmastanol et Stigmastérol. A noter que l'huile de pépins de grenade contient du cholestérol à une concentration de l'ordre de celle du chardon Marie alors que du cholestérol n'est pas détecté dans l'huile d'olive et d'argan et faiblement dans l'huile de Nigelle (**Zarrouk et al., 2019**).

**Tableau 9:** Composition en cholestérol et en phytostérols de l'huile de pépins de grenade.

$\mu\text{g} / \text{mg}$ Huile de pépins de grenade	
<b>Cholestérol</b>	4,280 $\pm$ 0,060
<b>Phytostérols</b>	
Campesterol	0,240 $\pm$ 0,170
Sitostérol	5,458 $\pm$ 0,000
Stigmastanol	0,074 $\pm$ 0,280
Stigmastérol	0,574 $\pm$ 0,010
<b>Total</b>	10,346 $\pm$ 0,580

*Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD*

#### 4.1.3. Quantification et identification des tocophérols

La quantification et l'identification des tocophérols ont été exprimées en ( $\text{ng} / \text{mg}$  d'huile). D'après le **Tableau 10**, l'huile de pépins de grenade contient essentiellement du  $\beta$ - et  $\gamma$ -tocophérol. La quantité de tocophérols totaux dans l'huile de pépins de grande utilisée est faible par rapport à celle trouvée dans les huiles d'olive, d'argan et de chardon Marie (**Zarrouk et al., 2019**).



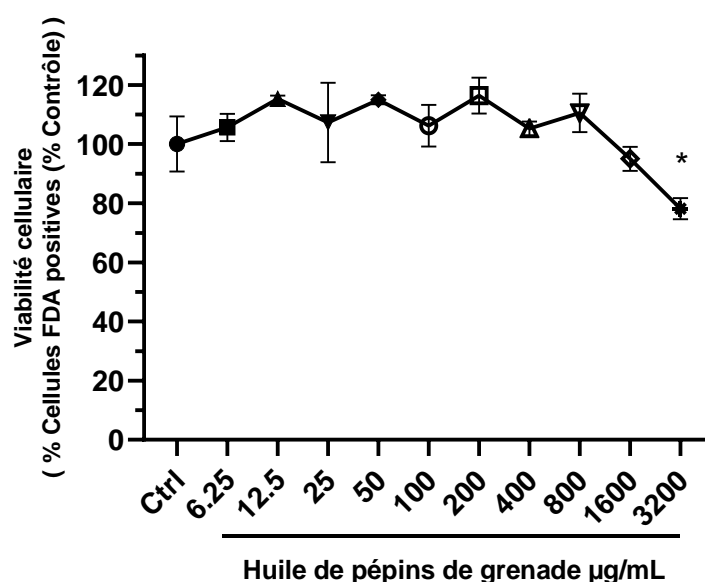
**Tableau 10:** Teneur en tocophérols de l'huile de pépins de grenade.

Tocophérols	mg / kg d'huile de pépins de grenade
Delta	0,100 ± 0,000
Bêta+Gamma	3,316 ± 0,090
Alpha	0,065 ± 0,000

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD

#### 4.2. Evaluation de la toxicité de l'huile de pépins de grenade : test FDA

L'effet de l'huile de pépins de grenade sur la viabilité cellulaire a été évalué en utilisant le test FDA. Les cellules N2a, après 24 h de culture, sont traitées pendant 72 h avec différentes concentrations de l'huile de pépins de grenade (6,25 à 3 200 µg / mL). Les résultats sont illustrés dans la **Figure 62**. Nos résultats ne montrent aucun effet toxique de l'huile de pépins de grenade (6,25 à 3 200 µg / mL) sur la viabilité cellulaire. Sur la base de ces résultats, l'huile de pépins de grenade (100 µg/mL ; 200 µg/mL) et l' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) ont été sélectionnés pour évaluer leur effets cytoprotecteurs.

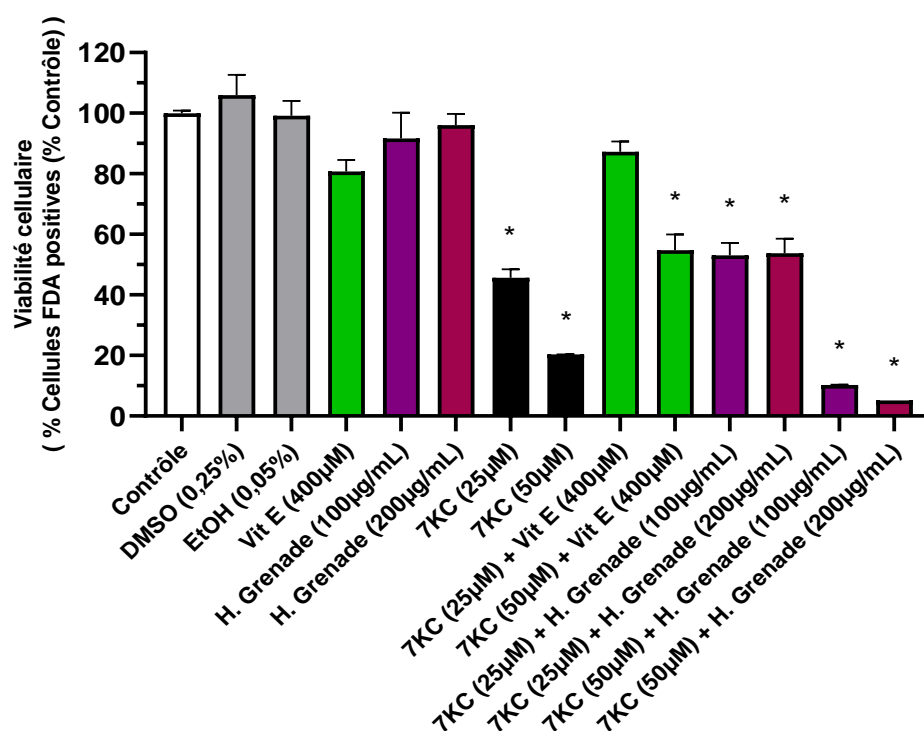


**Figure 62:** Effets de l'huile de pépins de grenade sur la viabilité cellulaire.

*Evaluation par le test FDA des effets de l'huile de pépins de grenade sur la viabilité cellulaire. Les cellules N2a ont été incubées pendant 72 h avec ou sans huile de pépins de grenade dans une gamme de 6,25 à 3200 µg / mL. Les résultats présentés sont la moyenne SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée comme statistiquement significative comparativement aux cellules non traitées (Contrôle), est indiquée par (\*).*

### 4.3. Evaluation de la cytoprotection de l'huile de pépins de grenade sur la toxicité du 7-cétocholestérol : test FDA

L'incubation des cellules N2a pendant 72h avec du 7KC (25 µM ;50 µM) a induit une nette diminution du pourcentage de cellules FDA positives. En revanche, le co-traitement des cellules N2a avec le 7KC associé à l'huile de pépins de grenade (100 µg/mL ; 200 µg/mL) ou à l' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) atténue la toxicité du 7KC. Aucune différence n'a été révélée entre contrôle, véhicules, et cellules traitées avec l'huile de pépins de grenade (100 µg/mL ; 200 µg/mL) et l' $\alpha$ -tocophérol (400 µM) (**Figure 63**).

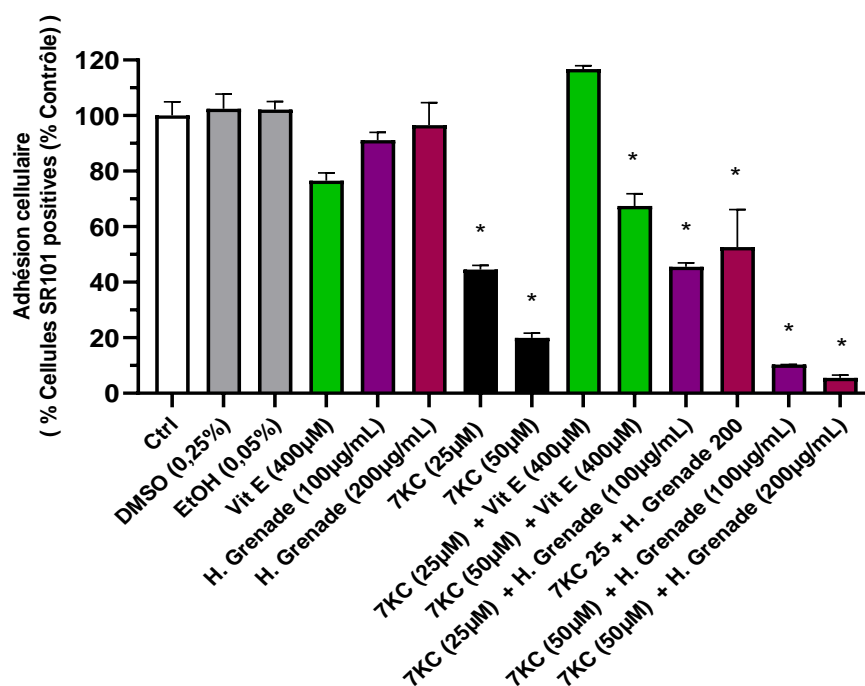


**Figure 63:** Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7-cétocholestérol (25 µM et 50 µM) sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol. *Evaluation par le test FDA. Les résultats présentés correspondent à la moyenne*

$\pm SD$  ( $n=6$ ) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni comparativement aux cellules non traitées (Contrôle). Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée comme statistiquement significative, est indiquée par (\*)

#### 4.4. Evaluation de la cytoprotection de l'huile de pépins de grenade sur la toxicité du 7-cétocholestérol : test SR101

Les effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol associés ou non au 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) sur l'adhésion cellulaire ont aussi été quantifiés par le test SR101. Les résultats sont présentés dans la **Figure 64**. L'adhésion cellulaire diminue significativement en présence du 7KC (25  $\mu$ M ; 50  $\mu$ M) par rapport aux cellules non traitées (contrôle), et aux véhicules (DMSO 0,25% ; EtOH 0,05%). Cette diminution observée avec le 7KC (25  $\mu$ M) est fortement atténuée en co-traitement avec l'huile de pépins de grenade (100  $\mu$ g/mL ; 200  $\mu$ g/mL) et l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M). Ainsi, l'huile de pépins de grenade (100  $\mu$ g/mL ; 200  $\mu$ g/mL) et l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M) atténuent la perte d'adhésion cellulaire induite par le 7KC (25  $\mu$ M). Aucune différence n'a été observée entre contrôle, véhicules, et cellules traitées avec l'huile de pépins de grenade (100  $\mu$ g/mL ; 200  $\mu$ g/mL) et l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M).

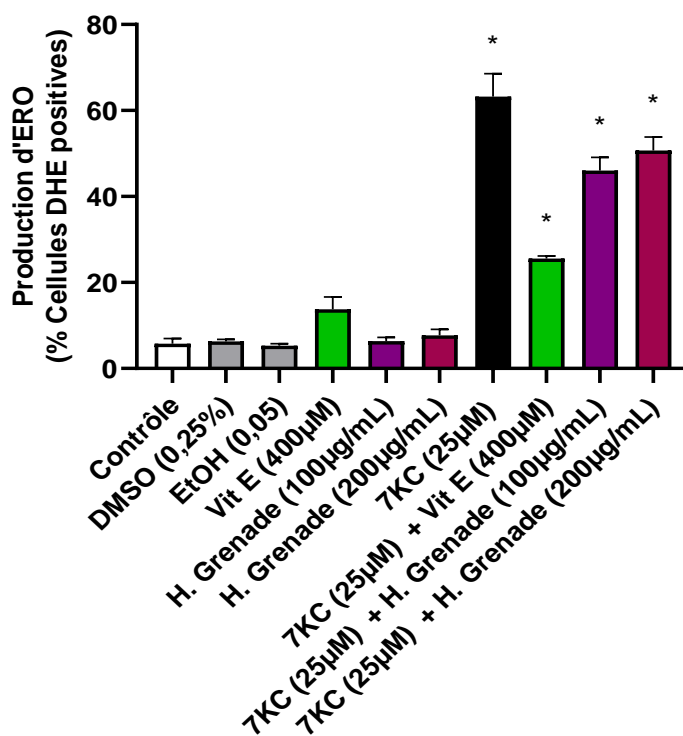


**Figure 64:** Evaluation de l'adhésion cellulaire en présence de 7-cétocholestérol (25  $\mu$ M et 50  $\mu$ M) sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins de grenade

et d' $\alpha$ -tocophérol. *Evaluation par le test SR101. Les résultats présentés correspondent à la moyenne  $\pm$  SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée par rapport aux cellules non traitées (Contrôle) à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de t-Student. Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée comme statistiquement significative, est indiquée par une étoile (\*).*

#### 4.5. Evaluation des effets de l'huile de pépins de grenade sur la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par le 7-cétocholestérol : évaluation par cytométrie en flux après coloration à la dihydroéthidine

La production d'ERO sur cellules N2a traitées pendant 72 h a été évaluée par coloration à la dihydroéthidine (DHE). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 65**. L'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation significative du pourcentage de cellules DHE positives reflétant une surproduction d'ERO en présence du 7KC (25  $\mu$ M). Cette augmentation est fortement atténuée lorsque le 7KC (25  $\mu$ M) est associé au l'huile de pépins de grenade (100  $\mu$ g / mL ; 200  $\mu$ g / mL) ou à l' $\alpha$ -tocophérol (400  $\mu$ M). Ainsi, l'huile de pépins de grenade, comme l' $\alpha$ -tocophérol, s'oppose à la surproduction d'ERO. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et le véhicule (EtOH 0,05 %).

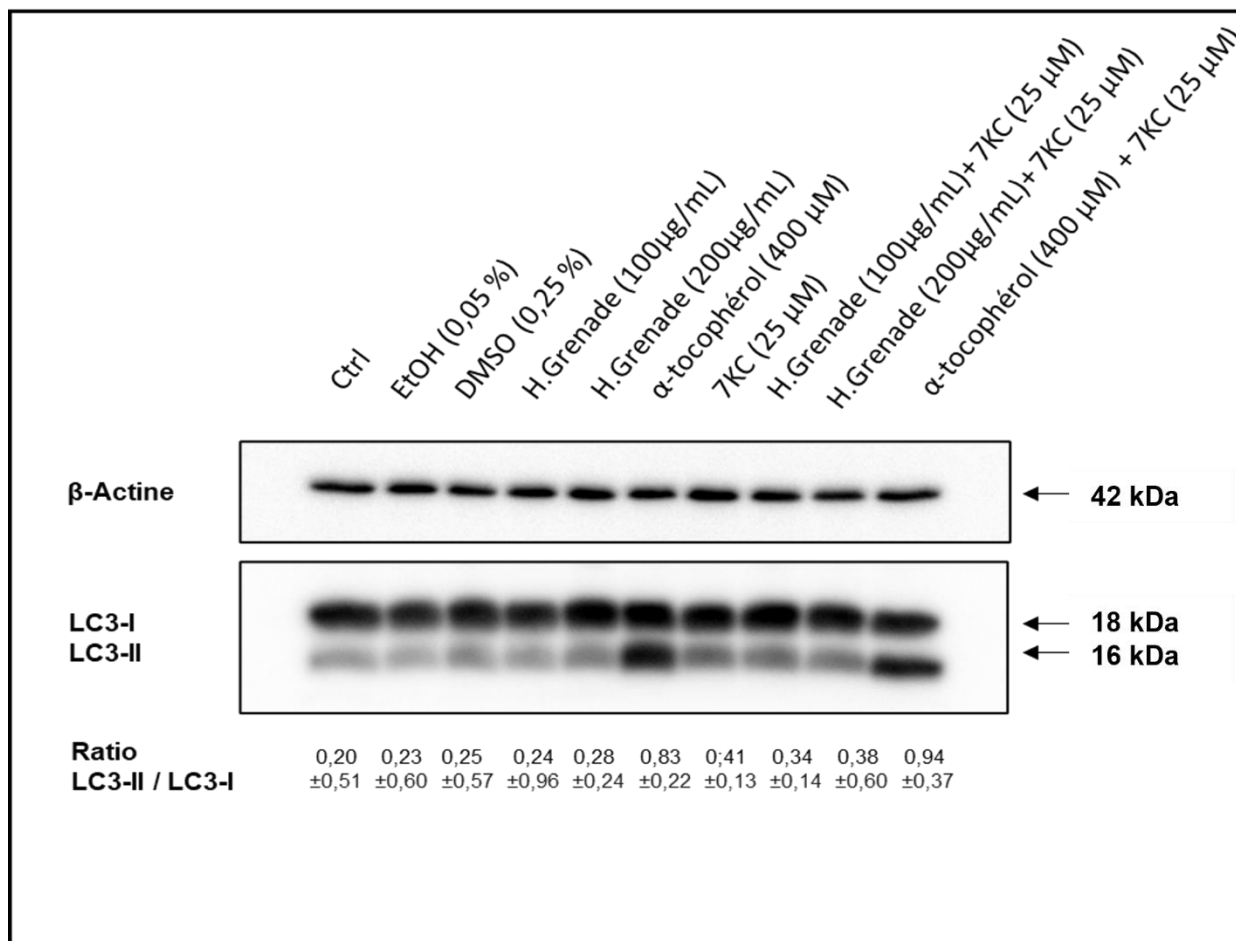


**Figure 65:** Mesure de la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) en présence de 7-cétocholestérol sur cellules N2a et évaluation des effets cytoprotecteurs de l'huile de pépins

de grenade et d' $\alpha$ -tocophérol. *Test de coloration au dihydroéthidium (DHE). Les résultats présentés correspondent la moyenne SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse multiple a été réalisée comparativement aux cellules non traitées (Contrôle) à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée comme statistiquement significative, est indiquée par (\*).*

#### **4.6. Analyse des effets de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol sur l'autophagie induite par le 7-cétocholestérol**

Les effets de l'huile de pépins de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol sur cellules traitées par le 7KC ont été analysés sur l'autophagie par western blot. Les concentrations utilisées pour les différents produits sont celles utilisées pour étudier la cytoprotection qui a été observée à la fois avec l'huile de pépins de grenade et l' $\alpha$ -tocophérol. On observe et confirme une forte induction d'autophagie avec le 7KC : le ratio LC3II/LC3I le plus élevé est observé avec ce composé. On constate que l'huile de pépin de grenade qui est cytoprotectrice diminue le rapport LC3II/LC3I, ce qui suggère que cette huile agit sur des voies de signalisation impliquées dans l'autophagie. La présence d'une bande LC3II intense avec l' $\alpha$ -tocophérol laisse supposer que la cytoprotection observée fait intervenir un processus d'autophagie de survie. Cette bande intense a été observée pour tous les western blot réalisés (**Figure 66**). L'autophagie de survie devrait théoriquement être inhibée en utilisant des inhibiteurs d'autophagie tels que la chloroquine, la rapamycine ou l'inhibiteur LY294002.



**Figure 66:** Analyse des effets de l’huile de pépins de grenade et de l’ $\alpha$ -tocophérol sur l’autophagie induite par le 7-cétocholestérol sur cellules N2a : analyse par western blot.

### III. Caractérisation des activités de deux huiles essentielles méditerranéennes (jasmin, thym) sur des kératinocytes humains HaCaT établis en lignée

#### 1. Caractérisation des huiles essentielles de jasmin et de thym

##### 1.1. Composition chimique de l’huile essentielle de jasmin

Le profil chromatographique montre la présence des trois composés principaux : l’acétate de benzyle, le benzoate de benzyle. Ces trois composés sont les trois composés majoritaires. La proportion relative des trois composés est respectivement de 15,9 % ; 10,2 % et 5,3 % (**Annexe 3**). On observe aussi clairement la présence de linalool.

Ces composés ont été identifiés à partir de leur spectre de masse et comparaison avec la bibliothèque de spectres de référence du NIST, et également à l'aide d'un standard dans le cas du linalool. La composition phytochimique est conforme aux données de la littérature (**Joulain, 2021**).

## 1.2. Composition chimique de l'huile essentielle de thym

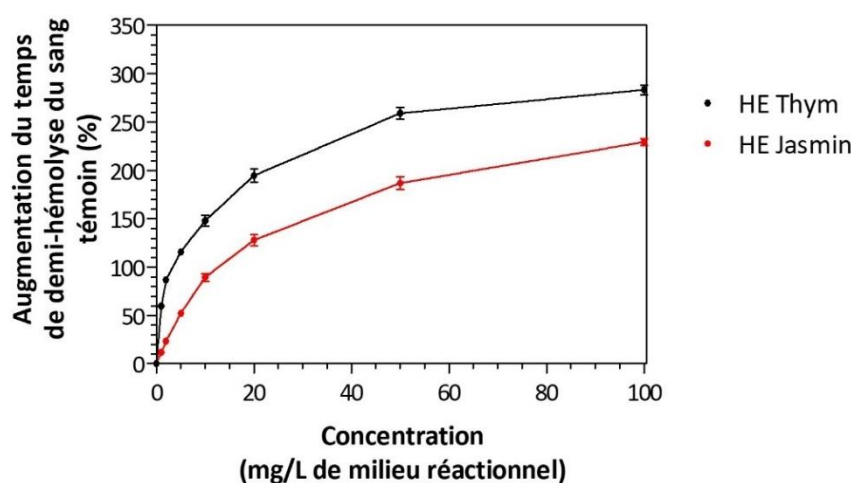
Le profil chromatographique montre trois principaux constituants caractéristiques : le thymol, le *p*-cymène et le  $\gamma$ -terpinène.

Ces composés ont été identifiés à partir de leur spectre de masse et comparaison avec la bibliothèque de spectres de référence du NIST, et également à l'aide d'un standard dans le cas du thymol et du *p*-cymène.

Ces trois composés majoritaires (thymol, *p*-cymène et  $\gamma$ -terpinène) ont respectivement des proportions relatives de 49,2 % ; 18,7 % et 6,7 % (**Annexe 4**). On observe aussi clairement la présence de linalool.

## 1.3. Propriété antioxydante des huiles essentielles de jasmin et de thym : analyse par le test KRL

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles (HEs) de jasmin et de thym ont été mesurées par le test KRL (**Annexe 5**). D'après les résultats obtenus avec le test KRL (**Figure 67**), on observe que l'HE de thym présente une activité antioxydante plus importante que celle de l'HE de jasmin.

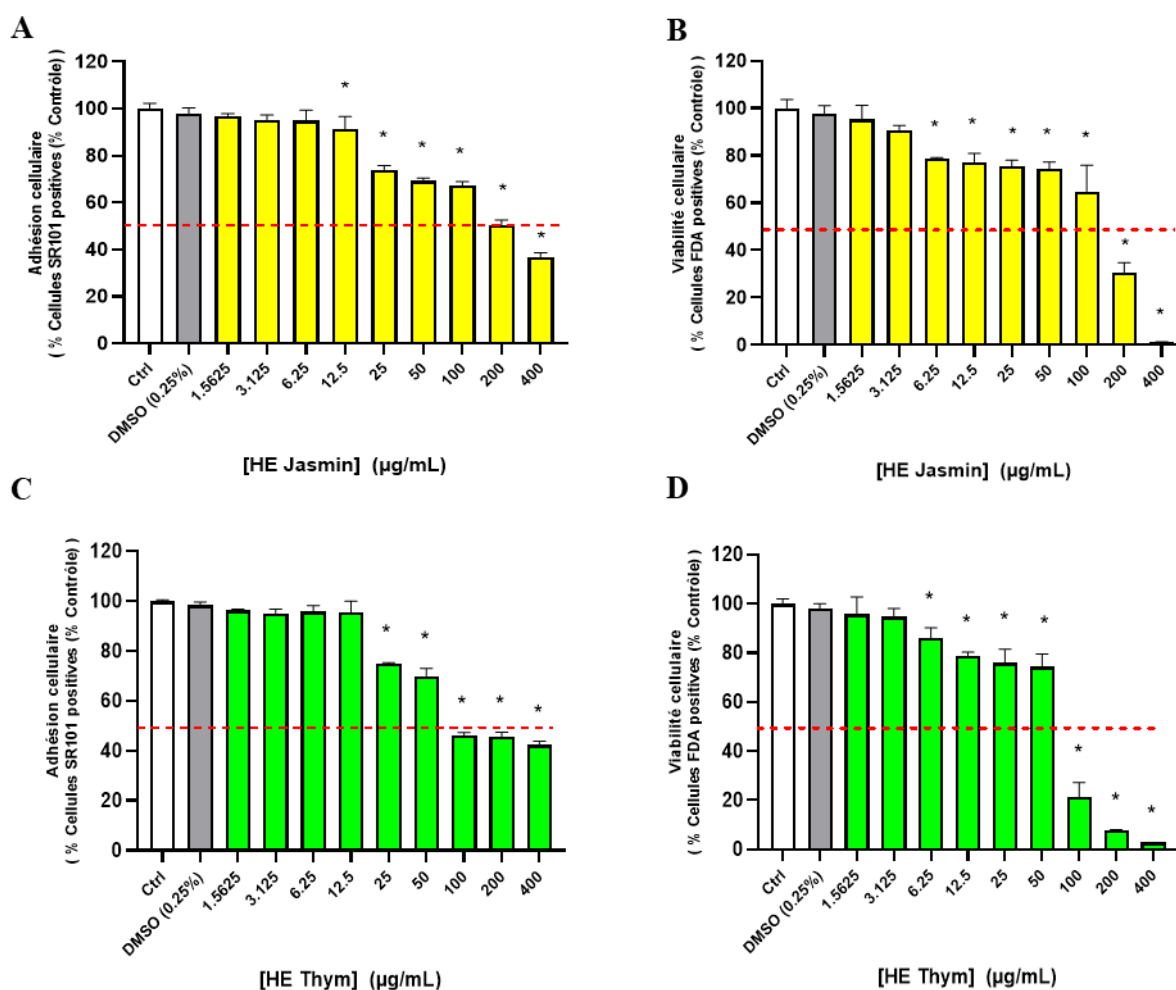


**Figure 67:** Quantification de l'activité antioxydante des HEs de jasmin et de thym par test KRL

## 2. Etude de la toxicité des huiles essentielles de jasmin et de thym sur cellules HaCaT

Les effets cytotoxiques des HEs de jasmin et de thym sur la viabilité cellulaire ont été étudiés par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) et à la Sulforhodamine 101 (SR 101). Pour cela, les cellules HaCaT ont été traitées pendant 24h dans une gamme de concentrations d'HEs allant de 1,5625  $\mu\text{g} / \text{mL}$  à 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

D'après les résultats présentés dans la **Figure 68**, on constate une diminution de la viabilité cellulaire associée à une baisse de l'adhésion des cellules : diminution du pourcentage de cellules FDA positives et du pourcentage de cellules SR101 positives. Cela permet de déterminer des IC50 comprises entre 200 et 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pour l'HE de jasmin et entre 100 et 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pour l'HE de thym.



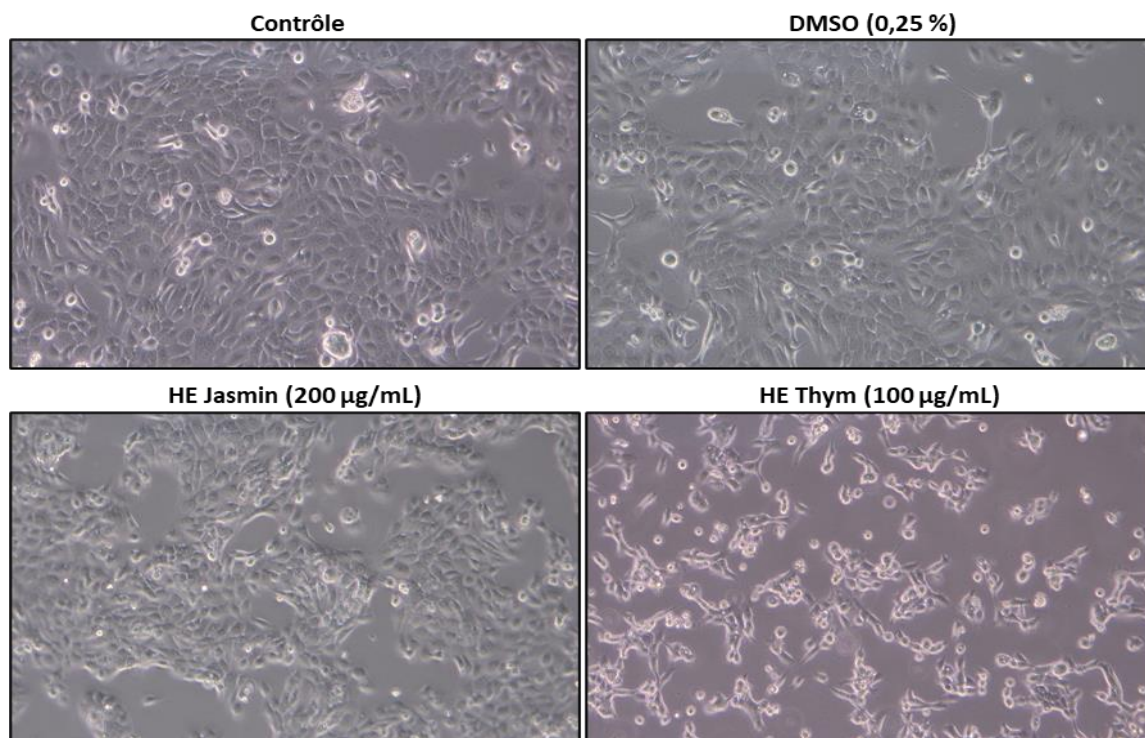


**Figure 68:** Effets des HEs sur la viabilité des cellules HaCaT : test SR101 et FDA. *Evaluation des effets des HEs de jasmin et de thym par le test SR 101 (mesure des cellules adhérentes) (Figures A et C) et par le test FDA (mesure de la viabilité cellulaire) (Figures B et D). Les cellules HaCaT ont été incubées pendant 24 h avec ou sans HEs de jasmin et de thym dans une gamme de concentrations de 1,5625 à 400 µg / mL. La ligne pointillée rouge indique la valeur de la concentration (ou la gamme de concentrations) réduisant la viabilité cellulaire de 50 % (IC50). Les résultats présentés sont la moyenne ± SD (n=6) de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. Une valeur  $p \leq 0,05$ , considérée statistiquement significative, est indiquée par (\*) comparativement aux cellules non traitées (Contrôle).*

### **3. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur la morphologie des cellules HaCaT**

Après 24h de traitement en absence et en présence des les HEs de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL) (concentrations correspondant aux IC50), la morphologie des cellules HaCaT à été observée par microscopie à contraste de phase. Les résultats obtenus sont montrés dans la **Figure 69**.

On constate, comparativement aux cellules HaCaT non traitées (contrôle), des changements morphologiques prononcés au niveau des cellules traitées par les HEs, en particulier avec les cellules traitées par l'HE de thym.

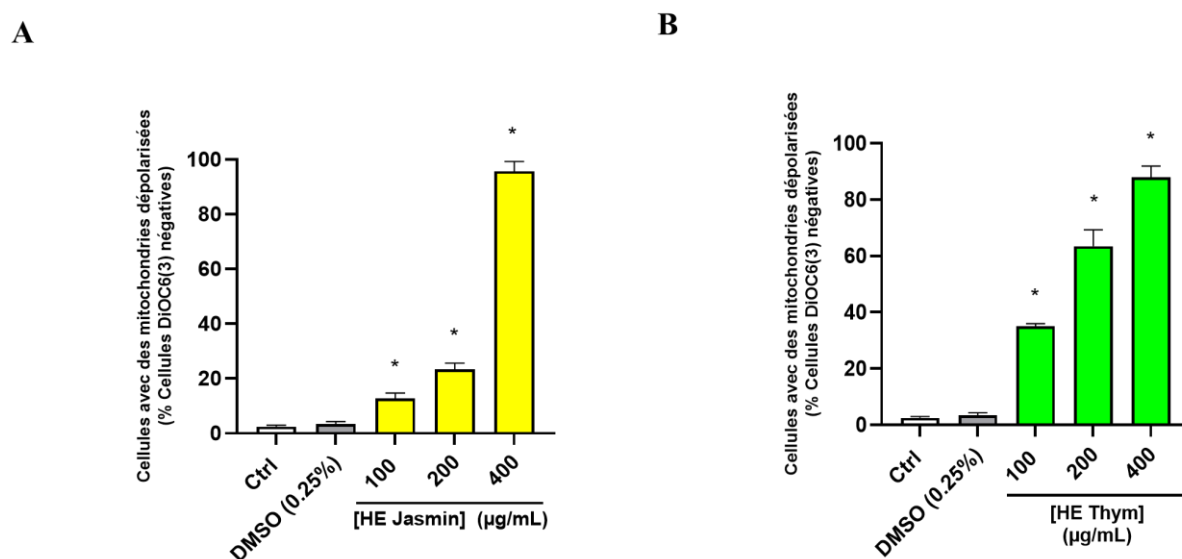


**Figure 69:** Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules HaCaT.

*Les cellules HaCaT ont été traitées pendant 24h par les HEs de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL), et observées en microscopie à contraste de phase (Grossissement x 200).*

#### **4. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire mitochondrial : évaluation par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3)**

Après avoir traité les cellules HaCaT pendant 24h par les HEs de jasmin et de thym, on constate que ces huiles (à concentrations élevées) déclenchent des dysfonctionnements mitochondriaux associée à une perte plus ou moins prononcée de  $\Delta\Psi_m$ . L'HE de jasmin et de thym induisent une chute de  $\Delta\Psi_m$  à partir de concentrations respectives de l'ordre de 200 µg / mL (**Figure A**) et de 400 µg / mL (**Figure B**). Les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées par le véhicule (DMSO 0,25 %) ne présentent aucune différence significative du pourcentage des cellules DiOC<sub>6</sub>(3) négatives (**Figure 70**).

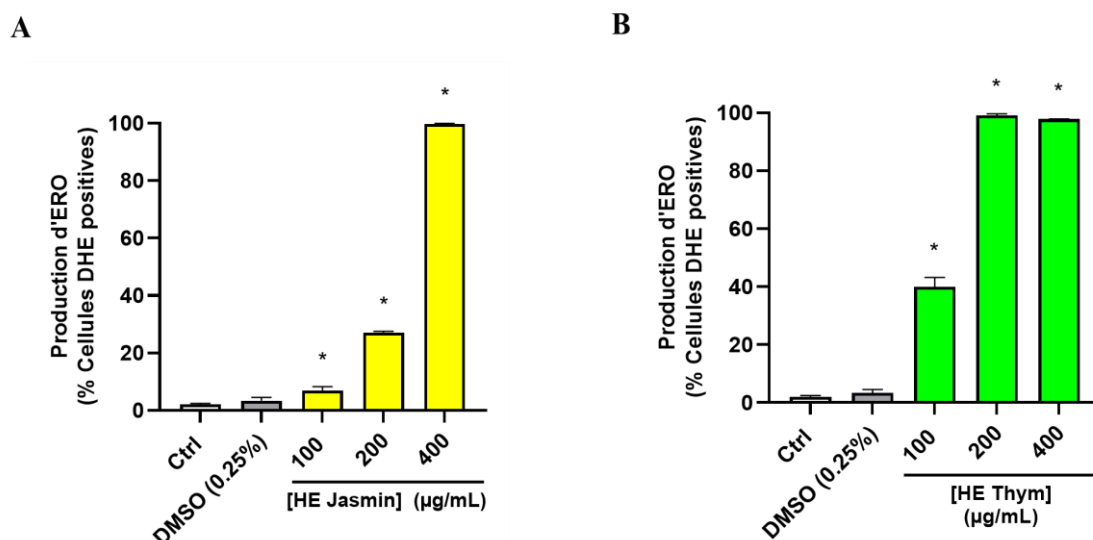


**Figure 70:** Effets des HEs de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Evaluation par cytométrie en flux des effets des HEs de jasmin et de thym sur le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ), coloration au DiOC<sub>6</sub>(3). Les cellules HaCaT ont été incubées pendant 24 h avec ou sans HEs de jasmin (**Figure A**) et de thym (**Figure B**) à des concentrations incluant les IC<sub>50</sub> (100, 200, 400 µg / mL). Les données sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

## 5. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le stress oxydant

### 5.1.Effet des huiles essentielles du jasmin et de thym sur la production des espèces réactives de l'oxygène

L'analyse par cytométrie en flux de la fluorescence émise par la dihydroéthidine a montré d'importants pourcentages de cellules surproduisant des ERO (cellules DHE positives) (**Figure 71**). La stimulation du stress oxydant a été observée à partir de 400 µg / mL pour l'HE de jasmin (**Figure A**) et à partir de 200 µg / mL pour l'HE de thym (**Figure B**) ; aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et le véhicule.



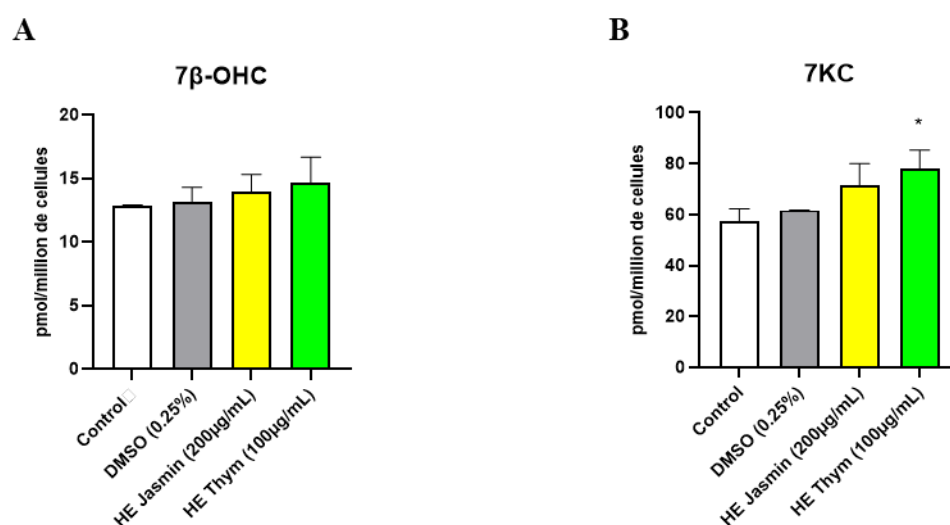
**Figure 71:** Effets des HEs de jasmin et de thym sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). *Evaluation par cytométrie en flux des effets des HEs de jasmin et de thym sur la production d'ERO par coloration à la dihydroéthidine (DHE). Les cellules HaCaT ont été incubées pendant 24 h avec ou sans HEs de jasmin et de thym à des concentrations incluant les IC50 (100, 200 et 400 µg / mL). Les données sont la moyenne ± SD de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative.*

## 5.2. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur la peroxydation lipidique évaluée par les concentrations intracellulaires de 7-cétocholestérol et 7β-hydroxycholestérol

La peroxydation lipidique inclut une oxydation des acides gras insaturés et en dernier lieu une oxydation du cholestérol (auto-oxydation du cholestérol) qui aboutit à la formation d'oxystérols majoritairement oxydés sur le carbone 7 (7-cétocholestérol et 7β-hydroxycholestérol) (Ghzaïel, Sassi, et al., 2022). La présence de ces deux oxystérols est synonyme d'un stress oxydant fort.

Sur cellules HaCaT traitées pendant 24h, l'effet des HEs de jasmin et de thym sur la peroxydation lipidique a été déterminée par la mesure des concentrations intracellulaires de

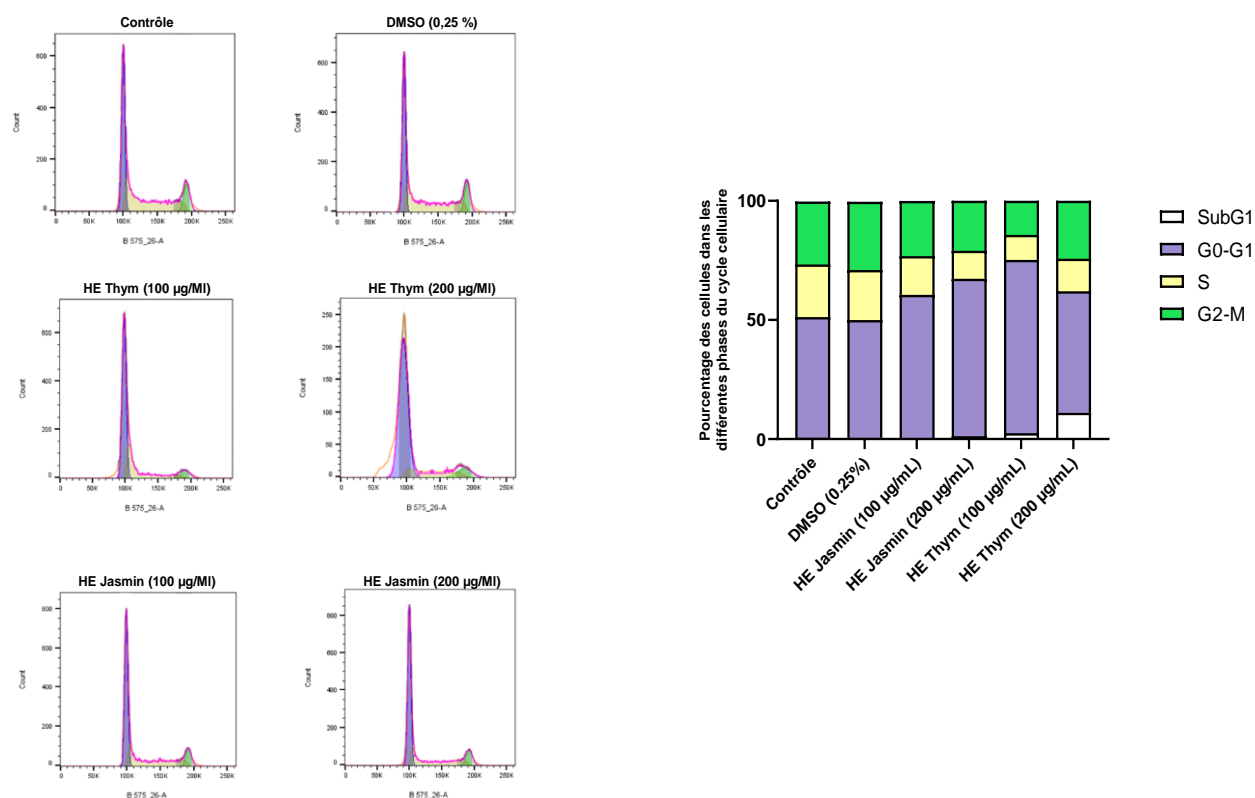
7KC et de  $7\beta$ -OHC. Les résultats des dosages, présentés dans la **Figure 72**, montrent une légère augmentation non significative des taux de  $7\beta$ -OHC dans les cellules HaCaT traitées par les HEs de jasmin (200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) et de thym (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). En revanche, la quantité de 7KC est légèrement mais significativement augmentée lorsque les cellules HaCaT sont traitées par l'HE de thym (100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et celles traitées par le véhicule (DMSO 0,25 %).



**Figure 72:** Mesure de la peroxydation lipidique par quantification des concentrations intracellulaires de 7KC et  $7\beta$ -OHC sur cellules HaCaT.

Les concentrations en  $7\beta$ -OHC (**Figure A**) et 7KC (**Figure B**) sont exprimées en pmol / million de cellules. Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considérée comme statistiquement significatif.

## 6. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le cycle cellulaire



**Figure 73 :** Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire : Effets des HEs sur le cycle cellulaire. Les cellules HaCaT ont été traitées avec les HEs de jasmin et de thym pendant 24h à des concentrations dans la gamme des IC50 (100 et 200 µg / mL). Représentation graphique : SubG1 (Blanc) ; Phase G0/G1 (Violet) ; Phase S (Jaune) ; Phase G2+M (Vert).

D'après les données obtenues et présentés dans la **Figure 73** et dans le **Tableau 11**, aucun changement n'a été observé dans la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. A une concentration de 200 µg / ml d'HE de thym, on observe un petit pic SubG1 significatif ( $11,1 \pm 0,1$  %) comparativement aux cellules non traitées (contrôle :  $0,6 \pm 0,1$  %) ; la présence du pic SubG1 est en faveur d'une faible induction d'apoptose (**Tableau 11**).

**Tableau 11:** Répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2+M) et quantification des cellules en SubG1 après traitement par les HEs de jasmin et de thym

	Phases du cycle cellulaire			
	SubG1	G0/G1	S	G2+M
Contrôle	0,6 ± 0,1	50,7 ± 0,8	22,2 ± 0,3	26,5 ± 1,2
DMSO (0,25 %)	0,6 ± 0,2	49,5 ± 0,7	21 ± 0,1	28,8 ± 0,3
HE jasmin (100 µg/mL)	0,3 ± 0,1	60,3 ± 0,2 *	16,3 ± 0,3 *	23,2 ± 0,1
HE jasmin (200 µg/mL)	1,3 ± 0,4 *	66 ± 0,9 *	11,8 ± 0,6 *	20,9 ± 0,7 *
HE thym (100 µg/ mL)	2,4 ± 0,3 *	72,8 ± 0,2 *	10,5 ± 0,1 *	14,3 ± 0,4 *
HE thym (200 µg/mL)	11,1 ± 0,1 *	51 ± 1,4	13,6 ± 0,6 *	24,3 ± 0,5

### 7. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le métabolisme des acides gras des cellules HaCaT

L'implication des mitochondries et des peroxyosomes dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol est bien établie (Pandak et al., 2002; Wanders & Waterham, 2006; Wanders, 2014).

Par conséquent, le profil des acides gras (acides gras allant de C14:0 à C24:6) a été déterminée par GC-MS sur cellules HaCaT traitées pendant 24h par les HEs de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL). Le profil fournit correspond à une analyse.

D'après les résultats obtenus (Tableau 12), sur cellules HaCaT traitées par les HEs, on peut observer des différences au niveau de certains acides gras (acide gras monoinsaturé C18:1 n-9 ; acides gras polyinsaturés C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:2 n-6, C20:4 n-6 (acide arachidonique), C20:5 n-3, C22:4 n-6) même si la quantité totale d'acides total ne semble pas différentes en présence d'HEs. La diminution du taux d'acide arachidonique suggère une activité anti-inflammatoire non cytokinique de ces HEs.

**Tableau 12: Profils des acides gras dans les cellules HaCaT traitées par les huiles essentielles de jasmin et de thym**

	Traitements			
	Contrôle	DMSO (0,25 %)	HE jasmin (200 µg/mL)	HE thym (100 µg/mL)
<b>Acides gras saturés</b>				
Acide myristique (C14:0)	2,57 ± 0,06	3,44 ± 0,29	3,34 ± 0,17	4,75 ± 0,48
Acide pentadécylique (C15:0)	0,15 ± 0,00	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02
Acide palmitique (C16:0)	58,14 ± 0,28	58,64 ± 6,64	67,48 ± 2,76	72,45 ± 5,12
Acide heptadécanique (C17:0)	0,28 ± 0,00	0,34 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,03
Acide stérique (C18:0)	24,77 ± 0,15	23,30 ± 2,87	29,42 ± 1,12	25,62 ± 1,18
Acide nonadécylique (C19:0)	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Acide arachidique (C20:0)	0,23 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Acide hénéicosylique (C21:0)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Acide béhénique (C22:0)	0,13 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,07 ± 0,01
Acide lignocérique (C24:0)	0,24 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Acide hyénique (C25:0)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Acide cérotique (C26:0)	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00
<b>Σ Acides gras saturés</b>	<b>86,78 ± 0,50</b>	<b>86,98 ± 0,96</b>	<b>101,22 ± 0,10</b>	<b>103,67 ± 0,88</b>
<b>Acides gras mono-insaturés</b>				
Acide myristoléique (C14:1)	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,17 ± 0,01
Acide palmitoléique (C16:1 n-7)	10,93 ± 0,04	13,47 ± 0,91	6,55 ± 0,17	10,79 ± 0,77
Acide hexadé-9-énoïque (C16:1 n-9)	0,94 ± 0,01	1,02 ± 0,25	0,79 ± 0,03	0,90 ± 0,11
Acide vaccénique (C18:1 n-7)	17,04 ± 0,07	23,67 ± 2,44	16,37 ± 0,75	16,55 ± 2,01
Acide oléique (C18:1 n-9)	114,66 ± 3,29	108,27 ± 2,80	64,49 ± 5,41	66,89 ± 2,39
Acide éicosa-7-énoïque (C20:1 n-7)	0,51 ± 0,00	0,66 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,60 ± 0,01
Acide gadoléique (C20:1 n-9)	0,25 ± 0,00	0,37 ± 0,09	0,40 ± 0,02	0,31 ± 0,05
Acide docosénoïque (C22:1 n-7)	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,04
Acide érucique (C22:1 n-9)	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,01	0,24 ± 0,03
Acide nervonique (C24:1 n-9)	0,42 ± 0,04	0,53 ± 0,07	0,37 ± 0,00	0,33 ± 0,03
C25:1	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Acide céremonoénique (C26:1)	0,35 ± 0,03	0,39 ± 0,06	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,04
<b>Σ Acides gras mono-insaturés</b>	<b>145,55 ± 0,50</b>	<b>148,96 ± 0,73</b>	<b>90,26 ± 0,45</b>	<b>97,15 ± 0,49</b>
<b>Acides gras poly-insaturés</b>				



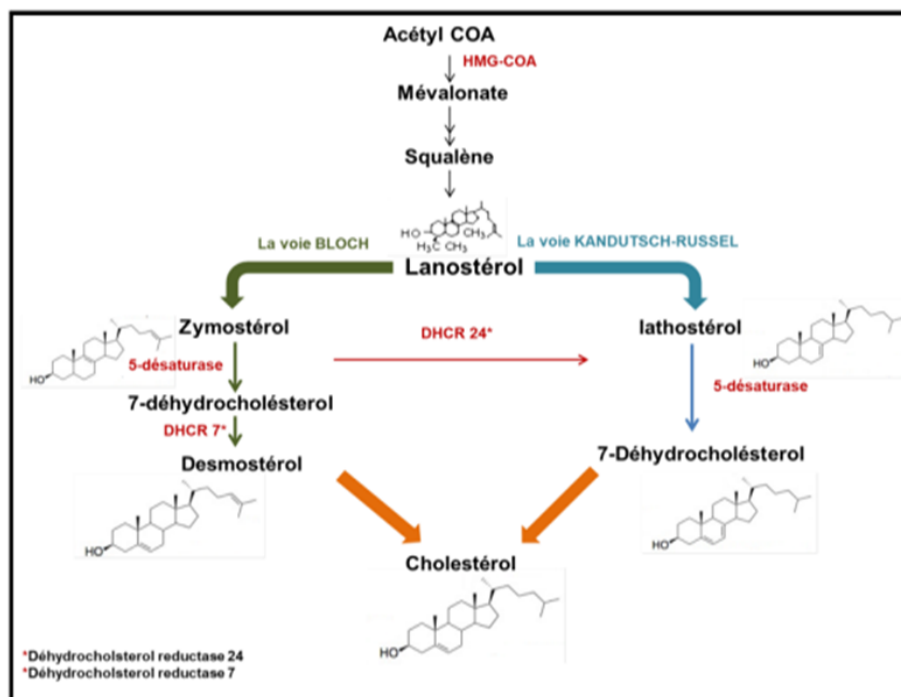
Acide linoléique (C18:2 n-6)	6,22 ± 0,01	7,49 ± 0,66	10,74 ± 0,13	5,23 ± 0,65
Acide α-linoléique (C18:3 n-3)	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,29 ± 0,12	0,09 ± 0,00
Acide γ-linoléique (C18:3 n-6)	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,09	0,12 ± 0,00	0,19 ± 0,04
Acide éicosadiénoïque (C20:2 n-6)	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,23 ± 0,02
Acide dihomo-γ-linoléique (C20:3 n-6)	0,94 ± 0,02	1,20 ± 0,03	0,94 ± 0,08	1,40 ± 0,21
Acide méadique (C20:3 n-9)	0,43 ± 0,04	0,66 ± 0,12	0,32 ± 0,01	0,40 ± 0,05
Acide arachidonique (C20:4 n-6)	17,72 ± 0,13	22,15 ± 0,54	10,86 ± 0,81	11,90 ± 1,42
Acide éicosapentaénoïque (C20:5 n-3)	2,48 ± 0,02	2,71 ± 0,80	1,02 ± 0,04	1,27 ± 0,13
Acide docosadiénoïque (C22:2 n-6)	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01
Acide docosatrinénoïque (C22:3 n-3)	ND	ND	0,11 ± 0,00	ND
Acide adrénique (C22:4 n-6)	0,50 ± 0,00	0,77 ± 0,21	1,62 ± 0,08	1,43 ± 0,19
Acide docosapentaénoïque (C22:5 n-3)	2,98 ± 0,01	4,23 ± 0,90	4,00 ± 0,16	3,63 ± 0,44
Acide docosapentaénoïque (C22:5 n-6)	2,92 ± 0,07	4,23 ± 0,90	4,00 ± 0,16	3,62 ± 0,45
Acide docosahexaénoïque (C22:6 n-3)	5,75 ± 0,09	7,65 ± 0,69	5,46 ± 0,25	6,23 ± 0,96
Acide tétracosatétranoïque (C24:4)	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Acide tétracosapentaénoïque (C24:5)	0,03 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Acide tétracosahexaénoïque (C24:6)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>Σ Acides gras poly-saturés</b>	40,48 ± 0,47	51,71 ± 0,99	40,15 ± 0,88	35,83 ± 0,57
<b>Σ Acides gras insaturés</b>	186,03 ± 0,49	200,67 ± 0,86	130,41 ± 0,67	132,98 ± 0,06
<b>Total des acides gras</b>	272,81 ± 10,54	287,65 ± 12,28	231,63 ± 15,40	236,65 ± 14,06

## 8. Effet des huiles essentielles de jasmin et de thym sur le métabolisme du cholestérol des cellules HaCaT

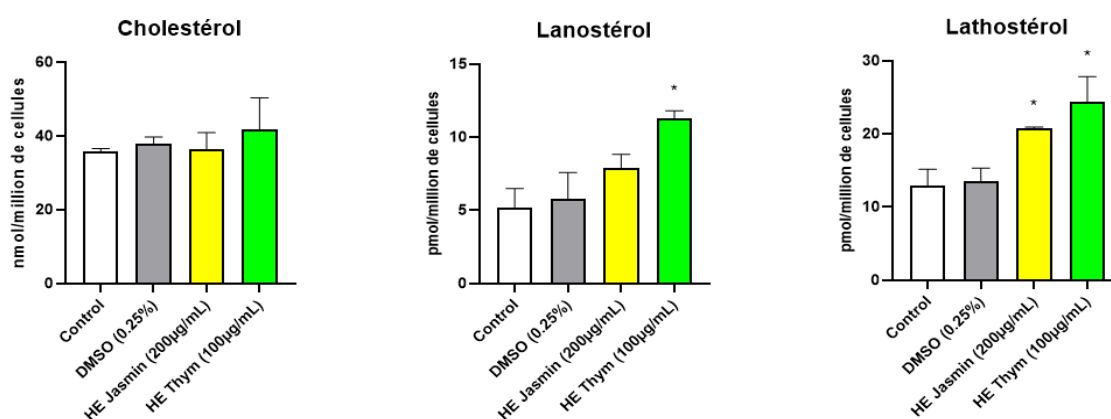
Le métabolisme du cholestérol des cellules HaCaT traitées par les HES de jasmin et de thym pendant 24h a été évalué par la détermination des taux de cholestérol et de ses précurseurs (lanostérol et lathostérol) par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 74**.

Les résultats montrent une légère augmentation non significative des taux de cholestérol dans les cellules traitées par les HES de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL). Cette augmentation a été aussi observée dans les teneurs du lanostérol. En revanche, les teneurs en lathostérol mesurées dans les cellules traitées par les HES de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL) sont plus élevées que dans les cellules contrôle. Entre les cellules non traitées (contrôle) et traitées par le véhicule (DMSO 0,25 %), aucune différence n'a été observée au niveau des taux de cholestérol, lanostérol et lathostérol.

A



B



**Figure 74:** Voies de biosynthèse du cholestérol et de ses précurseurs (lanostérol et lathostérol) dans les cellules HaCaT traitées ou non par les huiles essentielles de jasmin et de thym. (A) Voies de synthèse du cholestérol ; (B) Quantification du cholestérol et de certains de ses précurseurs (lanostérol et lathostérol) sur cellules HaCaT traitées et non traitées par les HEs de jasmin (200 µg / mL) et de thym (100 µg / mL). La quantification a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les données correspondent à la moyenne  $\pm$  SD de deux expériences indépendantes réalisées en triplicat. La comparaison des données a été effectuée avec un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni. (\*) :  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significatif.

---

# DISCUSSION

---

➤ **Aza-stilbènes (AZA-STs) / trans-resvératrol (RSV)**

Le resvératrol, connu comme constituant majeur du régime méditerranéen, est l'un des polyphénols les plus étudiés, en particulier sous sa configuration trans, tant *in vitro* qu'*in vivo* (**Zhang et al., 2021**). Cette molécule se caractérise par diverses activités anti-vieillessement (**Li et al., 2021**), antioxydantes (**Silva et al., 2019**), anti-inflammatoires (**Alesci et al., 2022**) et anti-tumorales (**Yang et al., 2022**). Ces multiples propriétés biologiques du *trans*-resvératrol (RSV) peuvent être variées en fonction des concentrations utilisées notamment *in vitro*. En effet, à faibles concentrations (inférieures à 20 µM), le RSV présente des activités antioxydantes pouvant impliquer le facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf 2) par le blocage de la protéine (Kelch-like ECH-associated protein 1) (**Farkhondeh et al., 2020**). Le RSV peut aussi exercer des activités anti-inflammatoires (**Yamine et al., 2020**).

Au niveau antioxydant, le RSV neutralise les radicaux peroxydes en hydroxydes (**Cai et al., 2004**). Cette activité pourrait prévenir et atténuer les maladies liées à l'âge, ce qui fait du RSV molécule potentiellement sénolytique pour s'opposer au vieillissement (**Russo et al., 2020**).

Sur les cellules N2a, le RSV s'oppose aux effets toxiques induits par le 7KC et le 7β-OHC qui sont deux oxystérols dont les concentrations sont plus élevées chez les sujets âgés. Ces deux oxystérols constituent des dénominateurs communs au développement des maladies liées à l'âge : cancers, maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson), maladies oculaires, ostéoporose et sarcopénie (**Samadi et al., 2020; Nury et al., 2021; Rezig et al., 2022; Ghzaiel et al., 2022**). Cependant, le RSV présente, à fortes concentrations (à partir de 50 µM), un potentiel anti-tumoral conduisant à une mort apoptotique (**Delmas et al., 2011**). *In vivo*, le RSV peut augmenter la durée et l'espérance de vie chez *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et les souris aussi par la stimulation de la voie AMPK et l'activation des sirtuines (**Lagouge et al., 2006; Houtkooper et al., 2013**). L'un des premiers travaux de l'incidence de RSV sur l'espérance de vie a été effectué sur le *Nothobranchius furzei* (petit poisson ayant une courte durée) (**Terzibasi et al., 2007**).

Toutefois, l'inconvénient principal du RSV est son catabolisme rapide au niveau plasmatique d'une part et au niveau intestinal par plusieurs bactéries d'autre part. Cela atténue son activité biologique (**Yamine et al., 2021**). Dans ce contexte, afin de préserver les importants potentiels thérapeutiques du RSV, des dérivés du RSV appelés aza-stilbènes (AZA-STs) ont été synthétisés (**Lizard et al., 2020; Ksila et al., 2022**).

Ces AZA-STs ont montré des effets cytotoxiques *in vitro* sur les cellules N2a et des capacités anti-radicalaires augmentées mesurées par différentes techniques biochimiques (DPPH, FRAP et PAOT) et par le test KRL effectué en présence d'AAPH sur des globules rouges (**Ksila et al., 2022**). Les AZA-STs pourraient être de bons candidats en cancérologie et pour des maladies associées à des perturbations de l'homéostasie RedOX entraînant une surproduction d'ERO. Avant d'étudier les AZA-STs *in vivo*, il est primordial de mieux connaître leurs potentiels biologiques *in vitro* comparativement au RSV.

La viabilité cellulaire a été mesurée par différents tests tels que le test FDA permettant de quantifier l'activité estérase, et la coloration au Crystal violet qui sert à évaluer la quantité des cellules adhérentes (**Namsi et al., 2019; Yammine et al., 2020**). Les résultats obtenus ont montré une toxicité variable sur les cellules N2a avec les AZA-STs étudiés (1a-1g), soit plus faible, soit plus forte comparée à celle du RSV ; les valeurs des IC50 sont de l'ordre de 6,25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$ , à l'exception de l'AZA-ST 1a dont l'IC50 est supérieure à 25  $\mu\text{M}$ . La diminution de l'activité estérasique, correspondant à une perte de viabilité des cellules indique une altération de la membrane plasmique qui s'accompagne d'une baisse de l'adhérence cellulaire révélée par le test SR101. Ces différentes activités, bien établies pour le RSV, sont donc similaires avec les AZA-STs.

Par ailleurs, l'étude réalisée sur cellules N2a, a aussi montré l'impact des AZA-STs et du RSV sur la production d'ERO : ces derniers sont augmentés. De plus, la toxicité induite par les AZA-STs et le RSV provoque une augmentation de la perméabilité des cellules à l'iodure de propidium (IP) qui constitue un critère de mort cellulaire tout en indiquant une forte altération de la membrane plasmique (**Yeh et al., 1981; Lizard et al., 1995**). Cette détérioration de la membrane plasmique pourraient être due au stress oxydatif connu pour ses effets néfastes au niveau des composants lipidiques de la membrane. L'activation du stress oxydatif, avec les AZA-STs comme avec le RSV, pourrait donc être un événement clé impliqué dans la mort cellulaire.

Au niveau des mitochondries, les AZA-STs, comme le RSV, induisent des dysfonctions mitochondriales marquées qui se caractérisent par une chute de potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) observée à l'aide du fluorochrome DiOC<sub>6</sub>(3) (colorant cationique et lipophile qui s'accumule notamment dans la membrane mitochondriale proportionnellement à la valeur  $\Delta\Psi\text{m}$ ) et qui s'accompagnent aussi par une production accrue d'anions superoxydes mitochondriaux mesurée par cytométrie en flux après coloration au MitoSOX Red. Quel que soit le type de mort cellulaire, il est bien établi que la perte de  $\Delta\Psi\text{m}$  constitue un élément

irréversible (**Kroemer et al., 1997**). Cette chute de  $\Delta\Psi_m$  active la mort cellulaire par apoptose mais aussi tout type de mort. Ceci a été observé et confirmé dans le cas des cellules N2a traitées par le RSV. Les AZA-STs, en fonction des AZA-STs considérés, peuvent induire ou non une mort par apoptose alors que le RSV est un puissant pro-apoptotique. Une mort non apoptotique a été observée avec les AZA-STs 1a, 1c, 1e, 1f et 1g. En revanche, une mort partiellement apoptotique a été observée avec les AZA-STs 1b et 1d. Les résultats obtenus corroborent l'existence d'un type mixte de mort avec les AZA-STs. Avec les AZA-STs 1b et 1d, les cellules morphologiquement apoptotiques ne représentent qu'un tiers des cellules mortes quantifiées par la coloration à l'IP. Par ailleurs, en présence du RSV qui est un inducteur puissant d'apoptose, une augmentation du pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire a été induite alors qu'aucune modification significative de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle n'a été constatée qu'avec les AZA-STs (1a, 1c, 1e, 1f et 1g).

Concernant le stress oxydant tous les AZA-STs comme le RSV induisent un stress oxydant sur cellules N2a. Par contre, au niveau de la mort cellulaire induite, les AZA-STs se distinguent clairement du RSV : absence d'apoptose ou faible induction ; absence d'accumulation de cellules en phase S ou faible accumulation. Ces points communs et ces différences renforcent l'intérêt d'utiliser les AZA-STs dans des contextes où l'utilisation du RSV est limitée. L'évaluation des AZA-STs comme adjuvants de thérapies anti-tumorales (chimiothérapie et radiothérapie) semble importante sur différents modèles en particulier *in vivo*.

### ➤ Oxystérols / Huile de pépins de grenade

Certains oxystérols, en particulier le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC, sont présents en quantités abondantes dans les organes altérés et le plasma chez les personnes atteintes de maladies liées à l'âge (**Testa et al., 2018**). Ces deux oxystérols sont considérées parmi les molécules les plus cytotoxiques sur différents types cellulaires de diverses espèces (**Testa et al., 2018; Vejux et al., 2020**), provoquant du stress oxydant, des dysfonctionnements des organites et de l'inflammation ; ces oxystérols à concentrations élevées stimulent aussi la mort cellulaire dépendante ou indépendante des caspases (**Nury, Yammine, et al., 2021**). Les perturbations oxydatives sont supposées constituer l'un des principaux facteurs induisant le vieillissement des cellules. Dans les maladies neurodégénératives, dont les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, les dommages oxydatifs des cellules pourraient entraîner des anomalies de régénérescence neuronale. En conséquence, il est primordial i) d'évaluer et de mieux

comprendre la mort cellulaire par oxiaoptophagie, qui est un type de mort induit par le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC (Nury, Zarrouk, et al., 2021). Ce type de mort a été caractérisé à des temps précoces (24h et 48h) mais jamais à des temps tardifs (72h). Pour ce type de mort, il est important d'identifier des agents cytoprotecteurs naturels ou de synthèse avec pour objectif de s'opposer aux maladies liées à l'âge (Nury, et al., 2021).

Dans la présente étude, le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC ont montré des potentiels cytotoxiques sur les cellules neuronales murines N2a avec une toxicité plus importante avec le 7 $\beta$ -OHC. Le 7 $\alpha$ -OHC présente n'a montré aucune toxicité ce qui est en accord avec de nombreuses études réalisées sur plusieurs lignées cellulaires (Vejux et al., 2020). Ces activités cytotoxiques du 7KC et du 7 $\beta$ -OHC sont caractérisées par une induction de la mort cellulaire associée à une production accrue d'ERO ainsi qu'à des dysfonctions mitochondriales. Certains de ces effets ont été décrits dans travaux antérieurs sur des cellules cardio-vasculaires, des cellules musculaires, des cellules rétinienne et des cellules hématopoïétiques et immunitaires exposées au 7KC et/ou au 7 $\beta$ -OHC (Nury et al., 2015; Sghaier et al., 2019; Vejux et al., 2020; Ghzaïel, Zarrouk, et al., 2022). Sur les cellules N2a, le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC induisent, après des traitements à 72h, une chute de viabilité et une perte d'adhésion cellulaire qui se caractérise par une augmentation des cellules ayant un aspect rond et flottant dans le milieu de culture suggérant une altération des composants membranaires. Ces effets néfastes pourraient être activés par une rupture de l'équilibre RedOX qui va altérer la membrane plasmique en modifiant sa structure et ses caractéristiques physico-chimiques en modifiant ainsi l'homéostasie ionique (Na<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) avec changements importants sur nombreuses voies de signalisation, notamment celles impliquées dans l'activation de l'apoptose (Poli et al., 2013; Kunzelmann, 2016; Bezine et al., 2017; Vejux et al., 2020). La toxicité du 7KC et du 7 $\beta$ -OHC au niveau du système nerveux pourrait aussi aboutir à des altérations de l'influx nerveux (Bezine et al., 2017). Chez les patients atteints des maladies neurodégénératives, l'altération de l'influx nerveux pourrait contribuer au dysfonctionnement neuronal conduisant progressivement à une destruction des neurones. D'après les résultats obtenus avec le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC, il apparait que le stress oxydant caractérisé par une surproduction d'ERO est aussi un élément majeur dans la cascade d'évènements aboutissant à la mort cellulaire. En revanche, avec le 7 $\alpha$ -OHC, aucune surproduction d'ERO n'est observée. Cette surproduction de radicaux libres pourrait favoriser l'augmentation de produits issus de la peroxydation lipidique tels que le 4-HNE et le MDA ainsi qu'une réduction de l'expression et des activités des principales enzymes antioxydantes comme la GPx et la SOD (Yamine, Zarrouk, et al., 2020; Ghzaïel

**et al., 2021**). Ces résultats sont en accord avec les activités pro-oxydantes observées avec ces oxystérols sur différents types cellulaires (cellules microgliales BV-2, cellules musculaires C2C12, oligodendrocytes 158N et cellules de neuroblastome humain SH-SY5) sur lesquelles le déclenchement du stress oxydant présente un rôle clé dans la toxicité (**Nury et al., 2015; Zarrouk et al., 2018; Hammouda et al., 2021; Nury, Yammine, et al., 2021; Ghzaiel, Sassi, et al., 2022; Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2022**). Comme il est bien admis que la surproduction des ERO et les dysfonctions mitochondriales sont des phénomènes impliqués dans la sénescence et le vieillissement (**Rufini et al., 2013**), les résultats obtenus confortent l'hypothèse selon laquelle le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC pourraient participer au mécanisme de neurodégénérescence et de vieillissement des cellules neuronales. En effet, ces deux oxystérols altèrent les mitochondries et les protéines impliquées dans la fonction mitochondriale ce qui contribue non seulement une chute du potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) mais aussi des altérations de la fonction de la chaîne respiratoire et à une réduction de la production d'énergie favorisant une limitation de la production d'ATP. Ces modifications fonctionnelles mitochondriales dans les cellules N2a ont été également observées, en présence de 7KC ainsi que 7 $\beta$ -OHC, sur d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires C2C12 (**Ghzaiel et al., 2022**) et les oligodendrocytes 158N (**Nury et al., 2015; Sghaier et al., 2019**). Par ailleurs, sur les cellules N2a, la mort cellulaire par apoptose a été caractérisée par microscopie à lumière blanche après coloration au May-Grünwald-Giemsa et par la mesure de l'activation des caspases 3/7 par cytométrie en flux. Dans ce contexte, le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC induisent ce type de mort où des pourcentages élevés de cellules à noyaux condensés et/ou fragmentés sont observés et où des pourcentages importants de cellules caspases 3/7 positives sont détectés. Par contre, ces caractéristiques n'ont pas été observés avec les cellules N2a traitées avec du 7 $\alpha$ -OHC qui n'est pas toxique. De plus, des critères autophagiques ont été révélés par microscopie électronique et par cytométrie en flux en présence de 7KC et de 7 $\beta$ -OHC avec l'apparition des vacuoles de grandes tailles considérées comme des vacuoles autophagiques. Ces données sont cohérentes avec des études antérieures soulignant l'effet du 7KC ainsi que du 7 $\beta$ -OHC sur l'activation d'un processus d'autophagie (**Sassi et al., 2019; Yammine, Zarrouk, et al., 2020; Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2022**). Dans leur ensemble, les résultats obtenus confirment que les oxystérols (7KC et 7 $\beta$ -OHC) induisent sur cellules N2a traitées pendant 72h un type de mort particulier (oxyapoptophagie / 'oxiapoptophagy') qui associe du stress oxydant, de l'apoptose et des critères d'autophagie. Des effets cytoprotecteurs de l'huile de grenade et de l'alphatocophérol ont été observés.



Il est important de souligner que nos conditions expérimentales sont optimales pour bien identifier des agents cytoprotecteurs. En effet, des agents cytoprotecteurs doivent protéger à la fois à des temps de culture précoces (24 h) et tardifs (72 h) : ceci est le cas de l'huile de grenade et de l' $\alpha$ -tocophérol. En revanche, à 72 h, les cellules entrent progressivement dans un processus de mort spontanée ce qui rend plus difficile l'étude de la mort cellulaire (apoptose, autophagie) ; par conséquent pour l'étude de la mort cellulaire et des voies de signalisation associées des temps n'excédant 48 h doivent être privilégiés.

D'après les résultats obtenus sur les cellules N2a, pour prévenir la progression de la neurodégénérescence et atténuer la toxicité du 7KC qui est augmenté dans certaines maladies liées à l'âge, disposer des molécules ou un mélange de molécules naturelles ou synthétiques capables de s'opposer à la toxicité induite par le 7KC reste un challenge majeur ayant un intérêt thérapeutique (Nury et al., 2021). Seules quelques molécules naturelles (DHA,  $\alpha$ -tocophérol, biotine) et synthétiques (monométhyle fumarate, diméthyle fumarate) ainsi que certaines huiles telles que les huiles d'olive, de chardon-marie, d'argan, et de lentisque permettent de réduire la toxicité du 7KC et du  $7\beta$ -OHC. Nos données montrent que l'huile de pépins de grenade réduit la toxicité du 7KC sur les cellules N2a sans doute grâce à sa capacité antioxydante. Selon les résultats de la présente étude, les tests de viabilité effectués (FDA, SR101) ont montré que l'huile de pépins de grenade présente un effet cytoprotecteur contre le 7KC (25  $\mu$ M) en utilisant l' $\alpha$ -tocophérol comme molécule cytoprotectrice de référence. Il est bien établi que l' $\alpha$ -tocophérol est un composé efficace pour la prévention et/ou le ralentissement du développement de maladies fréquentes liées à l'âge : maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et certains cancers. D'après les résultats obtenus, la présence de tocophérols dans l'huile de pépins de grenade pourrait contribuer à la cytoprotection. Cependant, d'autres molécules comme des acides gras et des polyphénols pourraient aussi être impliquées (Nury et al., 2021).

Au niveau des acides gras, l'acide punique (isomère de l'acide linoléique) ainsi que l'acide oléique pourraient aussi intervenir dans la cytoprotection (Aruna et al., 2016; Holic et al., 2018; Vermond et al., 2021). Il a été montré que l'acide punique est antioxydant (Taner Bozkurt & Zeynep Ergun, 2021). Il a par ailleurs été bien démontré que l'acide oléique s'oppose à la toxicité du 7KC (Debbabi et al., 2017) et du  $7\beta$ -OHC aussi (Zarrouk et al., 2019; Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2022).

L'huile de pépins de grenade, associé au régime méditerranéen, pourrait être un nouvel agent cytoprotecteur vis-à-vis du 7KC. Le bénéfice de l'huile de pépins de grenade dans des maladies

liées à l'âge (**Guerra-Vázquez et al., 2022**), pour lesquelles des augmentations de 7KC et/ou de 7 $\beta$ -OHC sont observées méritent donc d'être approfondi.

➤ **Huiles essentielles (HEs) de jasmin et de thym**

Les huiles essentielles sont des extraits naturels concentrés dérivés de plantes. Un certain nombre d'HEs possède une large gamme de propriétés biologiques. La diversité moléculaire des composés des HEs leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variées (antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antioxydantes) (**Moghaddam & Mehdizadeh, 2017**).

La présente étude concerne les activités biologiques des HEs méditerranéennes de jasmin et de thym sur des kératinocytes humains HaCaT dans le contexte de l'impact sur le vieillissement cutané. La caractérisation de la composition chimique des HEs de jasmin et de thym a été effectuée par GC-MS. Les profils chromatographiques ont révélé trois composants majoritaires pour chaque HE : acétate de benzyle, benzoate de benzyle et linalool pour l'HE de jasmin, et thymol, p-cymène et  $\gamma$ -terpinène pour l'HE de thym. Il est bien connu que la plupart des HEs possèdent diverses activités biologiques telles qu'une activité antibactérienne (**Man et al., 2019**), une activité anti-inflammatoire (**Ko et al., 2021**), mais aussi une activité antioxydante (**Valdivieso-Ugarte et al., 2019**). Le test KRL a indiqué un potentiel antioxydant plus fort avec l'HE de thym que de jasmin. Les HEs de jasmin et de thym n'ont aucun effet sur la croissance et la multiplication cellulaire jusqu'à 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivement et n'induisent pas de modification significative de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. L'HE de thym a montré des effets cytotoxiques plus importants de l'HE de jasmin. Sur des kératinocytes humains HaCaT et par coloration au DiOC<sub>6</sub>(3), ces deux HEs méditerranéennes déclenchent des dysfonctionnements mitochondriaux à des fortes concentrations de 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pour l'HE de thym et de 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pour l'HE de jasmin. Ces altérations mitochondriales pourraient être provoquées par le stress oxydatif induit par ces HEs à fortes concentrations. Le stress oxydant est un inducteur majeur de dysfonctions mitochondriales pouvant endommager les kératinocytes et accélérer le vieillissement cutané (**Rinnerthaler et al., 2015**). Les HEs à faibles concentrations pourraient être bénéfiques en réduisant la surproduction d'ERO tout en étant pro-oxydantes et toxiques à fortes concentrations favorisant ainsi en excès le vieillissement cutané. En ce qui concerne le métabolisme lipidique, les résultats préliminaires obtenus ont montré des différences au niveau

de certains acides gras, du cholestérol et de précurseurs (lanostérol et lathostérol). Agir sur le profil lipidique pourrait aussi permettre d'agir sur le vieillissement cutané. Nos résultats montrent des effets que l'on peut considérer comme bénéfiques des HEs de jasmin et de thym lorsqu'elles sont utilisées à faibles concentrations sur les kératinocytes humains HaCaT ; en revanche, des concentrations élevées ont des effets inverses et sont significativement toxiques.

---

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

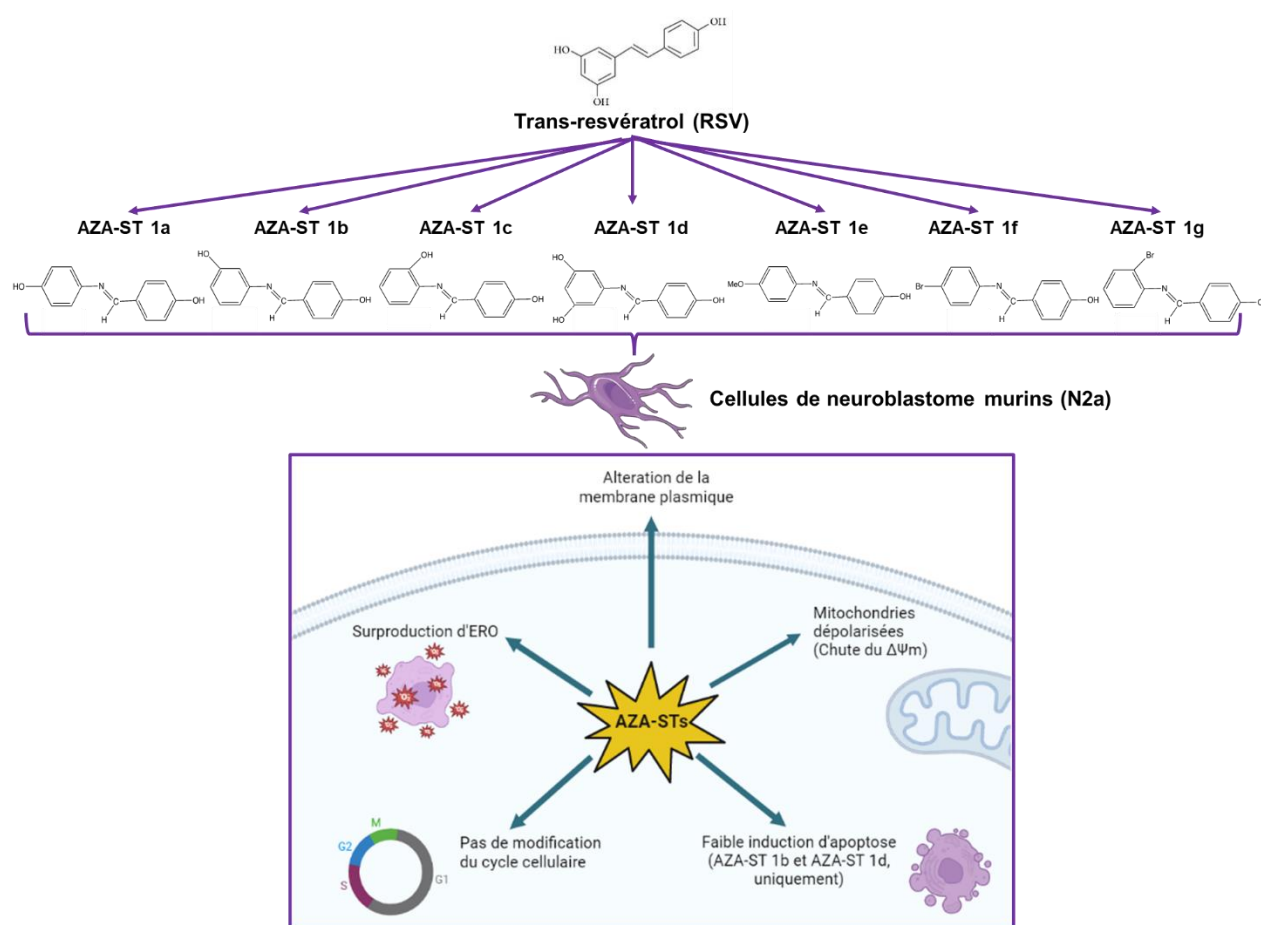
---

➤ **Aza-stilbènes (AZA-STs) / trans-resvératrol (RSV)**

Concernant le premier le premier axe de notre étude, qui a consisté à comparer les activités cytotoxiques des AZA-STs par rapport au RSV sur des cellules neuronales murines N2a, les résultats obtenus nous ont fourni plusieurs informations sur les propriétés de ces molécules et montrent que ces molécules sont toutes distinctes du RSV :

- ✓ Les AZA-STs possèdent des activités antioxydantes le plus souvent plus importantes que celles du RSV
- ✓ Les AZA-STs présentent une toxicité sur les cellules N2a dans une gamme de concentrations proche à celle du RSV.
- ✓ Les AZA-STs induisent des perturbations de l'équilibre RedOX qui se traduit par une surproduction d'ERO.
- ✓ Contrairement au RSV, les AZA-STs ne sont pas ou peu inducteurs de mort cellulaire par apoptose.
- ✓ Les AZA-STs induisent des dysfonctionnements mitochondriaux (diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial).
- ✓ Les AZA-STs n'ont pas d'effet sur le cycle cellulaire contrairement au RSV qui augmente le pourcentage de cellules en phase S. Les modifications les plus significatives sur le cycle cellulaire ont été observées avec AZA-ST 1b et AZA-ST 1d : la présence d'un pic SubG1 avec ces molécules conforte leurs propriétés pro-apoptotiques néanmoins bien plus faible que celle du RSV.

Les caractéristiques des AZA-STs sont illustrées dans la **Figure 75**.



**Figure 75: Effets des AZA-STs sur cellules N2a**

Compte tenu des données obtenues *in vitro*, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives :

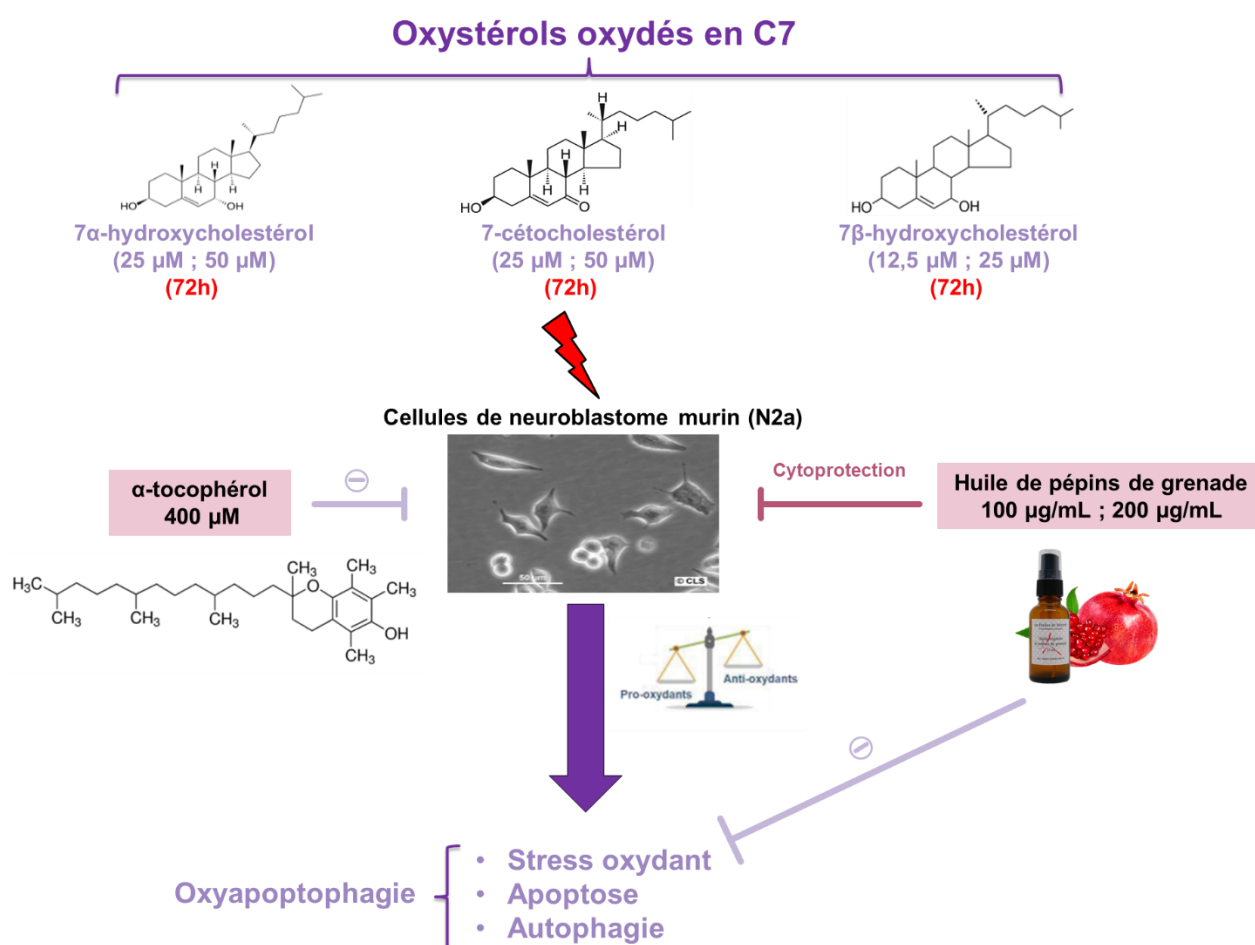
- ✓ Le RSV a montré des effets potentiels face aux maladies liées à l'âge, certains cancers, et des maladies inflammatoires chroniques. Il sera nécessaire de préciser et mieux caractériser les activités pharmacologiques des AZA-STs sur différents modèles de maladies *in vitro* et *in vivo*.
- ✓ Le RSV est connu aussi pour ses effets sur les cellules immunitaires et sur différentes voies de signalisation impliquées dans le métabolisme cellulaire. Des études supplémentaires sur les AZA-STs dans ces domaines mériteront d'être réalisées dans le cadre de l'immunothérapie du cancer et de la thérapie métabolique du cancer qui sont des stratégies émergentes et prometteuses de thérapie anti-tumorale.

➤ **Oxystérols / Huile de pépins de grenade**

En ce qui concerne la deuxième partie de notre étude (oxystérols et agents cytoprotecteurs ( $\alpha$ -tocophérol et huile de pépins de grenade) à un temps tardif de traitement (72h)), les résultats montrent que :

- ✓ Le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC induisent une mort par oxyapoptophagie sur cellules N2a ; le 7 $\beta$ -OHC est plus puissant que le 7KC.
- ✓ Le 7 $\alpha$ -OHC n'induit pas d'oxyapoptophagie.
- ✓ Le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC provoquent une surproduction d'ERO, ce qui entraîne une rupture de l'équilibre RedOX. Ces caractéristiques du stress oxydant ont été bien établies chez les personnes atteintes des maladies liées à l'âge, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives en particulier.
- ✓ Le 7KC et le 7 $\beta$ -OHC induisent des dysfonctionnements mitochondriaux. Ces altérations mitochondriales sont considérées comme un critère de vieillissement.
- ✓ L'huile de pépins de grenade et l' $\alpha$ -tocophérol ont des activités cytoprotectrices et réduisent significativement l'oxyapoptophagie induite par le 7KC.

Ces résultats sont résumés dans la **Figure 76**.



**Figure 76:** Effets des oxystérols oxydés en C7 (7KC, 7α-OHC, 7β-OHC) sur cellules neuronales N2a après 72h de traitement. Cytoprotection par l'huile de pépins de grenade et par l'α-tocophérol.

Les perspectives issues de ce travail sont les suivantes :

- ✓ L'identification d'une mort par oxyapoptophagie activée par le 7KC et le 7β-OHC permet d'envisager d'agir sur les voies de signalisation associées à ce type de mort.

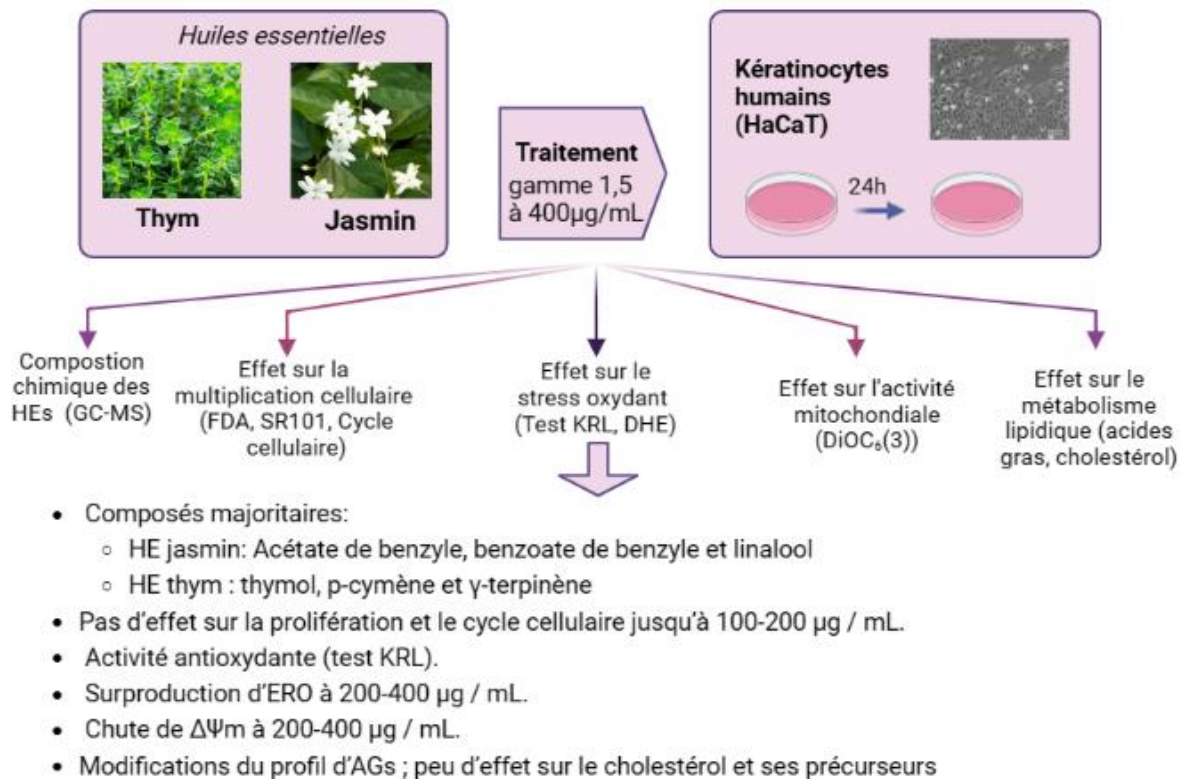


- ✓ Au même titre que les huiles d'argan et d'olive, l'huile de pépins de grenade, qui est associée au régime méditerranéen, a des activités cytoprotectrices vis-à-vis du 7KC. Une étude nutritionnelle contrôlée en milieu médicalisé est envisageable pour montrer les bienfaits d'un régime associé à l'huile de pépins de grenade chez les personnes âgées chez lesquelles des augmentations de 7KC et/ou de 7 $\beta$ -OHC seraient observées.
- ✓ Il serait aussi important d'étudier *in vivo* les effets d'une nourriture supplémentée en huile de pépins de grenade chez des souris sauvages ou génétiquement modifiées pour mimer des maladies liées à l'âge pour étudier les éventuels bénéfices de l'huile de pépins de grenade et son mode d'action. Une démarche analogue mériterait d'être réalisée avec l' $\alpha$ -tocophérol qui est actuellement l'agent cytoprotecteur à priori le plus efficace pour atténuer la toxicité du 7KC et du 7 $\beta$ -OHC.

➤ **Huiles essentielles (HEs) de jasmin et de thym**

- Pour ce qui est de la troisième partie de notre étude, qui a abordé les effets des HEs de jasmin et de thym en prenant en compte des aspects autres que les propriétés antiseptiques et bactéricides souvent étudiées, les résultats obtenus ont fourni des informations nouvelles sur les activités biologiques de ces HEs au niveau des kératinocytes humains qui constituent la première barrière entre l'environnement et le milieu intérieur.

Les résultats ont révélé des activités biologiques importantes des HEs à même de perturber le fonctionnement des kératinocytes ce qui met l'accent sur une utilisation raisonnée de ces huiles. Sur la base de ces résultats (**Figure 77**), il semble nécessaire d'approfondir les cibles cellulaires des HEs de jasmin et de thym sur différents types de cellules en particulier des cellules immunitaires et des cellules des voies respiratoires.



**Figure 77:** Effets des huiles essentielles (HEs) de jasmin et de thym sur des kératinocytes humains (HaCaT)

---

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aartsen, M. J., Smits, C. H. M., van Tilburg, T., Knipscheer, K. C. P. M., & Deeg, D. J. H. (2002). Activity in Older Adults : Cause or Consequence of Cognitive Functioning? A Longitudinal Study on Everyday Activities and Cognitive Performance in Older Adults. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, 57(2), P153-P162. <https://doi.org/10.1093/geronb/57.2.P153>
- Aboutit, K., Scarabelli, T. M., & McCauley, R. B. (2012). Autophagy in mammalian cells. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(1), 1-6. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i1.1>
- Adams, J., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Agarwal, U., Sitaraman, S., Mehta, S., & Panse, G. (2010). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 76(5), 591. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.69094>
- Aggarwal, B. B., Yuan, W., Li, S., & Gupta, S. C. (2013). Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities : Identification of novel components of turmeric. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(9), 1529-1542. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200838>
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols : Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00695-5](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00695-5)
- Aird, K. M., & Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 965, 185-196. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12)
- Alesci, A., Nicosia, N., Fumia, A., Giorgianni, F., Santini, A., & Cicero, N. (2022). Resveratrol and Immune Cells : A Link to Improve Human Health. *Molecules*, 27(2), 424. <https://doi.org/10.3390/molecules27020424>
- Allanbutterfield, D., Castegna, A., Lauderback, C., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death1. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 655-664. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00340-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00340-2)

- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3153. <https://doi.org/10.3390/ijms20133153>
- Ames, B. N. (2001). DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 7-20. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00070-7)
- Anderson, A., Campo, A., Fulton, E., Corwin, A., Jerome, W. G., & O'Connor, M. S. (2019). 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biology*, 29, 101380. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101380>
- Aruna, P., Venkataramamma, D., Singh, A. K., & Singh, R. P. (2016). Health Benefits of Punicic Acid : A Review: Health benefits of punicic acid. . . *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 16-27. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12171>
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils : From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Lall, N., Fibrich, B., van Staden, A. B., Hosenally, M., & Mahomoodally, M. F. (s. d.). Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 232-243. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.03.002>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation : Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438.
- Ayaz, M., Sadiq, A., Junaid, M., Ullah, F., Subhan, F., & Ahmed, J. (2017). Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 168. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00168>
- Baccarelli, A., Wright, R. O., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A. A., Suh, H. H., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P. S., & Schwartz, J. (2009). Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(7), 572-578. <https://doi.org/10.1164/rccm.200807-1097OC>

- Bagattin, A., Hugendubler, L., & Mueller, E. (2010). Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  promotes peroxisomal remodeling and biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(47), 20376-20381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009176107>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184-189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bansal, A., Rashid, C., Xin, F., Li, C., Polyak, E., Duemler, A., van der Meer, T., Stefaniak, M., Wajid, S., Doliba, N., Bartolomei, M. S., & Simmons, R. A. (2017). Sex- and Dose-Specific Effects of Maternal Bisphenol A Exposure on Pancreatic Islets of First- and Second-Generation Adult Mice Offspring. *Environmental Health Perspectives*, 125(9), 097022. <https://doi.org/10.1289/EHP1674>
- Barrientos, R. M., Kitt, M. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*, 309, 84-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.007>
- Bassene, E. (2012). Initiation a la recherche sur les substances naturelles : Extraction - analyse - essais biologiques. *Presses Universitaires de Dakar*.
- Beard, J. R., Officer, A., de Carvalho, I. A., Sadana, R., Pot, A. M., Michel, J.-P., Lloyd-Sherlock, P., Epping-Jordan, J. E., Peeters, G. M. E. E. (Geeske), Mahanani, W. R., Thiyagarajan, J. A., & Chatterji, S. (2016). The World report on ageing and health : A policy framework for healthy ageing. *The Lancet*, 387(10033), 2145-2154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00516-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00516-4)
- Beking, K., & Vieira, A. (2010). Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias : A population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition*, 13(9), 1403-1409. <https://doi.org/10.1017/S1368980009992990>
- Beltrán-Sánchez, H., Soneji, S., & Crimmins, E. M. (2015). Past, Present, and Future of Healthy Life Expectancy : Figure 1. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(11), a025957. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025957>

- Benny, A., & Thomas, J. (2019). Essential Oils as Treatment Strategy for Alzheimer's Disease : Current and Future Perspectives. *Planta Medica*, 85(03), 239-248. <https://doi.org/10.1055/a-0758-0188>
- Bento-Silva, A., Koistinen, V. M., Mena, P., Bronze, M. R., Hanhineva, K., Sahlstrøm, S., Kitrytė, V., Moco, S., & Aura, A.-M. (2020). Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids : Do we understand individual variability? *European Journal of Nutrition*, 59(4), 1275-1293. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01987-6>
- Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis : The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135-147. <https://doi.org/10.1038/nrm3737>
- Bernardi, P., Carraro, M., & Lippe, G. (2022). The mitochondrial permeability transition : Recent progress and open questions. *The Febs Journal*, 289(22), 7051-7074. <https://doi.org/10.1111/febs.16254>
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., & Lippe, G. (2015). The Mitochondrial Permeability Transition Pore : Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 95(4), 1111-1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Baini, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols : From Theory to Practice. *Foods*, 10(11), 2595. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
- Bezine, M., Debbabi, M., Nury, T., Ben-Khalifa, R., Samadi, M., Cherkaoui-Malki, M., Vejux, A., Raas, Q., de Sèze, J., Moreau, T., El-Ayeb, M., & Lizard, G. (2017). Evidence of K<sup>+</sup> homeostasis disruption in cellular dysfunction triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24:0) in 158N murine oligodendrocytes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 135-150. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.03.006>
- Bhalla, Y., Gupta, V. K., & Jaitak, V. (2013). Anticancer activity of essential oils : A review: Anticancer activity of essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3643-3653. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6267>
- Bherer, L., Erickson, K. I., & Liu-Ambrose, T. (2013). A Review of the Effects of Physical Activity and Exercise on Cognitive and Brain Functions in Older Adults. *Journal of Aging Research*, 2013, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/657508>

- Biscussi, B., Richmond, V., Baier, C. J., Mañez, P. A., & Murray, A. P. (2020). Design and Microwave-Assisted Synthesis of Aza-Resveratrol Analogs with Potent Cholinesterase Inhibition. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 19(8), 630-641. <https://doi.org/10.2174/1871527319666200905121536>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533), 387-403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bollineni, R. C., Hoffmann, R., & Fedorova, M. (2014). Proteome-wide profiling of carbonylated proteins and carbonylation sites in HeLa cells under mild oxidative stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 68, 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.030>
- Bondonno, C. P., Yang, X., Croft, K. D., Considine, M. J., Ward, N. C., Rich, L., Puddey, I. B., Swinny, E., Mubarak, A., & Hodgson, J. M. (2012). Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women : A randomized controlled trial. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.028>
- Bonkowski, M. S., & Sinclair, D. A. (2016). Slowing ageing by design : The rise of NAD<sup>+</sup> and sirtuin-activating compounds. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(11), 679-690. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.93>
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Galastri, L., Marceca, M. T., & Guffanti, E. E. (2006). Antioxidant Potential of Thymol Determined by Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils and Cell-Free Systems. *Pharmacology*, 76(2), 61-68. <https://doi.org/10.1159/000089719>
- Brahmi, F., Vejux, A., Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Meddeb, W., Rezig, L., Namsi, A., Sassi, K., Yammine, A., Badreddine, I., Vervandier-Fasseur, D., Madani, K., Boulekbache-Makhlouf, L., Nasser, B., & Lizard, G. (2019). Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(19), 3179-3198. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1491828>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease : Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brocard, C., & Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1 : Is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1565-1573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.022>



- Brooks-Wilson, A. R. (2013). Genetics of healthy aging and longevity. *Human Genetics*, 132(12), 1323-1338. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1342-z>
- Brown, A. J., & Jessup, W. (2009). Oxysterols : Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>
- Buchbauer, G., & Jirovetz, L. (1994). Aromatherapy—Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(5), 217-222. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730090503>
- Burt, S. (2004). Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Butterfield, D. A., Perluigi, M., & Sultana, R. (2006). Oxidative stress in Alzheimer’s disease brain : New insights from redox proteomics. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.06.026>
- Cai, Y.-J., Wei, Q.-Y., Fang, J.-G., Yang, L., Liu, Z.-L., Wyche, J. H., & Han, Z. (2004). The 3,4-dihydroxyl groups are important for trans-resveratrol analogs to exhibit enhanced antioxidant and apoptotic activities. *Anticancer Research*, 24(2B), 999-1002.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited Review : Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Campisi, J., & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence : When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cardenas, E., & Ghosh, R. (2013). Vitamin E : A Dark Horse at the Crossroad of Cancer Management. *Biochemical pharmacology*, 86(7), 845-852. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.018>
- Carmona, J. J., & Michan, S. (2016). Biology of Healthy Aging and Longevity. *Revista De Investigacion Clinica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutricion*, 68(1), 7-16.

- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C., & Ali, M. M. (s. d.). Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *eLife*, 4, e03522. <https://doi.org/10.7554/eLife.03522>
- Casadesus, G., Shukitt-Hale, B., Stellwagen, H. M., Zhu, X., Lee, H.-G., Smith, M. A., & Joseph, J. A. (2004). Modulation of Hippocampal Plasticity and Cognitive Behavior by Short-term Blueberry Supplementation in Aged Rats. *Nutritional Neuroscience*, 7(5-6), 309-316. <https://doi.org/10.1080/10284150400020482>
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Di Minno, G., & Ritieni, A. (2019). Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*, 24(19), 3626. <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Chan, Y.-C., Hosoda, K., Tsai, C.-J., Yamamoto, S., & Wang, M.-F. (2006). Favorable Effects of Tea on Reducing the Cognitive Deficits and Brain Morphological Changes in Senescence-Accelerated Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(4), 266-273. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.266>
- Chao, F., Gerland, P., Cook, A. R., & Alkema, L. (2019). Systematic assessment of the sex ratio at birth for all countries and estimation of national imbalances and regional reference levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(19), 9303-9311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812593116>
- Chaplin, A., Carpené, C., & Mercader, J. (2018). Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients*, 10(11), 1651. <https://doi.org/10.3390/nu10111651>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271-281. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: Dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139-1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Chimento, A., Santarsiero, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., De Luca, A., Infantino, V., Parisi, O. I., Avena, P., Bonomo, M. G., Saturnino, C., Sinicropi, M. S., & Pezzi, V. (2021). A Phenylacetamide Resveratrol Derivative Exerts Inhibitory Effects on Breast Cancer Cell Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5255. <https://doi.org/10.3390/ijms22105255>
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular cell*, 37(3), 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>

- Cinar, D., & Tas, D. (2015). Cancer in the elderly. *Northern Clinics of Istanbul*, 2(1), 73-80. <https://doi.org/10.14744/nci.2015.72691>
- Cipolla, C. M., & Lodhi, I. J. (2017). Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(4), 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.12.003>
- Colcombe, S., & Kramer, A. F. (2003). Fitness Effects on the Cognitive Function of Older Adults: A Meta-Analytic Study. *Psychological Science*, 14(2), 125-130. <https://doi.org/10.1111/1467-9280.t01-1-01430>
- Colica, C., Milanović, M., Milić, N., Aiello, V., De Lorenzo, A., & Abenavoli, L. (2018). A Systematic Review on Natural Antioxidant Properties of Resveratrol. *Natural Product Communications*, 13(9), 1934578X1801300. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300923>
- Colin, D., Gimazane, A., Lizard, G., Izard, J.-C., Solary, E., Latruffe, N., & Delmas, D. (2009). Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 124(12), 2780-2788. <https://doi.org/10.1002/ijc.24264>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Corbi, G., Acanfora, D., Iannuzzi, G. L., Longobardi, G., Cacciatore, F., Furgi, G., Filippelli, A., Rengo, G., Leosco, D., & Ferrara, N. (2008). Hypermagnesemia Predicts Mortality in Elderly with Congestive Heart Disease: Relationship with Laxative and Antacid Use. *Rejuvenation Research*, 11(1), 129-138. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0583>
- Cosman, F., de Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S., & Lindsay, R. (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International*, 25(10), 2359-2381. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-2794-2>
- Costantino, S., Paneni, F., & Cosentino, F. (2016). Ageing, metabolism and cardiovascular disease. *The Journal of Physiology*, 594(8), 2061-2073. <https://doi.org/10.1113/JP270538>

- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J.-P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., & Zamboni, M. (2010). Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, 39(4), 412-423. <https://doi.org/10.1093/ageing/afq034>
- Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., & Zamboni, M. (2019). Sarcopenia : Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, 48(1), 16-31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
- Csekes, E., & Račková, L. (2021). Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12641. <https://doi.org/10.3390/ijms222312641>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), 23-38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- de Almagro, M. C., & Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (iap) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology*. Oct;34(3):200-11. PMID: 23070005.
- Debbabi, M., Zarrouk, A., Bezine, M., Meddeb, W., Nury, T., Badreddine, A., Karym, E. M., Sghaier, R., Bretillon, L., Guyot, S., Samadi, M., Cherkaoui-Malki, M., Nasser, B., Mejri, M., Ben-Hammou, S., Hammami, M., & Lizard, G. (2017). Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 151-170. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002>
- de Grey, A. D. N. J. (2002). Bioremediation meets biomedicine : Therapeutic translation of microbial catabolism to the lysosome. *Trends in Biotechnology*, 20(11), 452-455. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02062-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02062-0)

- Delmas, D., Solary, E., & Latruffe, N. (2011). Resveratrol, a Phytochemical Inducer of Multiple Cell Death Pathways: Apoptosis, Autophagy and Mitotic Catastrophe. *Current Medicinal Chemistry*, 18(8), 1100-1121. <https://doi.org/10.2174/092986711795029708>
- Denzel, M. S., Lapierre, L. R., & Mack, H. I. D. (2019). Emerging topics in *C. elegans* aging research: Transcriptional regulation, stress response and epigenetics. *Mechanisms of ageing and development*, 177, 4-21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.08.001>
- Depreter, M., Espeel, M., & Roels, F. (2003). Human peroxisomal disorders. *Microscopy Research and Technique*, 61(2), 203-223. <https://doi.org/10.1002/jemt.10330>
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3(4), 461-491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Diczfalusy, U. (2013). On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol. *Biochimie*, 95(3), 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.016>
- Erdinest, N., London, N., Lavy, I., Morad, Y., & Levinger, N. (2021). Vision through Healthy Aging Eyes. *Vision*, 5(4), 46. <https://doi.org/10.3390/vision5040046>
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293-298. <https://doi.org/10.1038/nature01629>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., ... Martínez-González, M. A. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *New England Journal of Medicine*, 378(25), e34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>

- Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., Chalmers, J., Rodgers, A., & Rahimi, K. (2016). Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death : A systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 387(10022), 957-967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8)
- Evans, W. J., & Lexell, J. (1995). Human Aging, Muscle Mass, and Fiber Type Composition. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 50A(Special), 11-16. [https://doi.org/10.1093/gerona/50A.Special\\_Issue.11](https://doi.org/10.1093/gerona/50A.Special_Issue.11)
- Fan, C., Zhao, C., Zhang, F., Kesarwani, M., Tu, Z., Cai, X., Davis, A. K., Xu, L., Hochstetler, C. L., Chen, X., Guo, F., Huang, G., Azam, M., Tian, W., Lu, Q. R., & Zheng, Y. (2021). Adaptive responses to mTOR gene targeting in hematopoietic stem cells reveal a proliferative mechanism evasive to mTOR inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(1), e2020102118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020102118>
- Fang, E. F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B. A., Kerr, J. S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M. M., Caponio, D., Dan, X., Rocktäschel, P., Croteau, D. L., Akbari, M., Greig, N. H., Fladby, T., Nilsen, H., Cader, M. Z., Mattson, M. P., Tavernarakis, N., & Bohr, V. A. (2019). Mitophagy inhibits amyloid- $\beta$  and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 22(3), 401-412. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing : A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30(2), 87-95. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00415.x>
- Farkhondeh, T., Folgado, S. L., Pourbagher-Shahri, A. M., Ashrafizadeh, M., & Samarghandian, S. (2020). The therapeutic effect of resveratrol : Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110234. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110234>
- Ferdinandusse, S., Denis, S., van Roermund, C. W. T., Wanders, R. J. A., & Dacremont, G. (2004). Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *Journal of Lipid Research*, 45(6), 1104-1111. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300512-JLR200>

- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy : The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377-388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Archives of Dermatology*, 138(11). <https://doi.org/10.1001/archderm.138.11.1462>
- Fournel, S., Genestier, L., Rouault, J.-P., Lizard, G., Flacher, M., Assossou, O., & Revillard, J.-P. (1995). Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS Letters*, 367(2), 188-192. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00532-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00532-E)
- Fraldi, A., Annunziata, F., Lombardi, A., Kaiser, H.-J., Medina, D. L., Spanpanato, C., Fedele, A. O., Polishchuk, R., Sorrentino, N. C., Simons, K., & Ballabio, A. (2010). Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *The EMBO Journal*, 29(21), 3607-3620. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.237>
- Freeman, N. E., Rusinol, A. E., Linton, M., Hachey, D. L., Fazio, S., Sinensky, M. S., & Thewke, D. (2005). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase promotes oxidized LDL/oxysterol-induced apoptosis in macrophages. *Journal of Lipid Research*, 46(9), 1933-1943. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500101-JLR200>
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory Networks during Cellular Senescence : Causes and Consequences. *Trends in molecular medicine*, 16(5), 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>
- Fricke, T. R., Tahhan, N., Resnikoff, S., Papas, E., Burnett, A., Ho, S. M., Naduvilath, T., & Naidoo, K. S. (2018). Global Prevalence of Presbyopia and Vision Impairment from Uncorrected Presbyopia. *Ophthalmology*, 125(10), 1492-1499. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.013>
- Frontera, W. R. (2017). Physiologic Changes of the Musculoskeletal System with Aging. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 28(4), 705-711. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2017.06.004>
- Gaffney, C. J., Pollard, A., Barratt, T. F., Constantin-Teodosiu, D., Greenhaff, P. L., & Szewczyk, N. J. (2018). Greater loss of mitochondrial function with ageing is associated with earlier onset of sarcopenia in *C. elegans*. *Aging*, 10(11), 3382-3396. <https://doi.org/10.18632/aging.101654>

- Galiniak, S., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), Article 1. [https://doi.org/10.18388/abp.2018\\_2749](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2749)
- Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2009). RIP Kinases Initiate Programmed Necrosis. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1(1), 8-10. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp007>
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). Necroptosis : A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell*, 135(7), 1161-1163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.004>
- Gao, J., Ellis, L. B. M., & Wackett, L. P. (2010). The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: Improving public access. *Nucleic Acids Research*, 38 (Database issue), D488-D491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp771>
- Gavahian, M., & Farahnaky, A. (2018). Ohmic-assisted hydrodistillation technology : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.014>
- Ghemrawi, R., & Khair, M. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6127. <https://doi.org/10.3390/ijms21176127>
- Ghzaiel, I., Sassi, K., Zarrouk, A., Ghosh, S., Dias, I. H. K., Nury, T., Ksila, M., Essadek, S., Tahri Joutey, M., Brahmi, F., Mihoubi, W., Rup-Jacques, S., Samadi, M., Rezig, L., Meziane, S., Ghrairi, T., Masmoudi-Kouki, O., Hammami, S., Nasser, B., ... Lizard, G. (2022). Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies : Food and biomedical applications. *Redox Experimental Medicine*, 2022(1), R40-R56. <https://doi.org/10.1530/REM-22-0005>
- Ghzaiel, I., Zarrouk, A., Essadek, S., Martine, L., Hammouda, S., Yammine, A., Ksila, M., Nury, T., Meddeb, W., Tahri Joutey, M., Mihoubi, W., Caccia, C., Leoni, V., Samadi, M., Acar, N., Andreoletti, P., Hammami, S., Ghrairi, T., Vejux, A., ... Lizard, G. (2022). Protective effects of milk thistle (*Sylibum marianum*) seed oil and  $\alpha$ -tocopherol against 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced peroxisomal alterations in murine C2C12 myoblasts : Nutritional insights associated with the concept of pexotherapy. *Steroids*, 183, 109032. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109032>



- Ghzaïel, I., Zarrouk, A., Nury, T., Libergoli, M., Florio, F., Hammouda, S., Ménétrier, F., Avoscan, L., Yammine, A., Samadi, M., Latruffe, N., Biressi, S., Levy, D., Bydlowski, S. P., Hammami, S., Vejux, A., Hammami, M., & Lizard, G. (2021). Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia lentiscus L. Seed Oil against 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts : Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. *Antioxidants*, 10(11), 1772. <https://doi.org/10.3390/antiox10111772>
- Giacobini, E., Cuello, A. C., & Fisher, A. (2022). Reimagining cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Brain*, 145(7), 2250-2275. <https://doi.org/10.1093/brain/awac096>
- Gialluisi, A., Santoro, A., Tirozzi, A., Cerletti, C., Donati, M. B., de Gaetano, G., Franceschi, C., & Iacoviello, L. (2021). Epidemiological and genetic overlap among biological aging clocks : New challenges in biogerontology. *Ageing Research Reviews*, 72, 101502. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101502>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy : Cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Gomes, M. J., Martinez, P. F., Pagan, L. U., Damatto, R. L., Mariano Cezar, M. D., Ruiz Lima, A. R., Okoshi, K., & Okoshi, M. P. (2017). Skeletal muscle aging : Influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget*, 8(12), 20428-20440. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14670>
- Gordon, C. M., Gordon, L. B., Snyder, B. D., Nazarian, A., Quinn, N., Huh, S., Giobbie-Hurder, A., Neuberg, D., Cleveland, R., Kleinman, M., Miller, D. T., & Kieran, M. W. (2011). Hutchinson-Gilford Progeria Is a Skeletal Dysplasia. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(7), 1670-1679. <https://doi.org/10.1002/jbmr.392>
- Gordon, L. B., Rothman, F. G., López-Otín, C., & Misteli, T. (2014). Progeria : A Paradigm for Translational Medicine. *Cell*, 156(3), 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.028>
- Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., DeCarli, C., Greenberg, S. M., Iadecola, C., Launer, L. J., Laurent, S., Lopez, O. L., Nyenhuis, D., Petersen, R. C., Schneider, J. A., Tzourio, C., Arnett, D. K., Bennett, D. A., Chui, H. C., Higashida, R. T., Lindquist, R., Nilsson, P. M., ... Seshadri, S. (2011). Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(9), 2672-2713. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182299496>

- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 686. <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Grütter, M. G. (2000). Caspases : Key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 649-655. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00146-9)
- Guerra-Vázquez, C. M., Martínez-Ávila, M., Guajardo-Flores, D., & Antunes-Ricardo, M. (2022). Punicic Acid and Its Role in the Prevention of Neurological Disorders : A Review. *Foods*, 11(3), 252. <https://doi.org/10.3390/foods11030252>
- Guevara-Aguirre, J., Rosenbloom, A. L., Balasubramanian, P., Teran, E., Guevara-Aguirre, M., Guevara, C., Procel, P., Alfaras, I., De Cabo, R., Di Biase, S., Narvaez, L., Saavedra, J., & Longo, V. D. (2015). GH Receptor Deficiency in Ecuadorian Adults Is Associated With Obesity and Enhanced Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(7), 2589-2596. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1678>
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 67-71. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00234-4)
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). [Oxidative stress]. *Revue Medicale De Liege*, 62(10), 628-638.
- Hammouda, S., Ghzaiel, I., Picón-Pagès, P., Meddeb, W., Khamlaoui, W., Hammami, S., Muñoz, F. J., Hammami, M., & Zarrouk, A. (2021). Nigella and Milk Thistle Seed Oils : Potential Cytoprotective Effects against 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-Induced Toxicity on SH-SY5Y Cells. *Biomolecules*, 11(6), 797. <https://doi.org/10.3390/biom11060797>
- Hardy, J. (2017). The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the “amyloid cascade hypothesis”. *The FEBS Journal*, 284(7), 1040-1044. <https://doi.org/10.1111/febs.14004>
- Heo, J.-R., Kim, S.-M., Hwang, K.-A., Kang, J.-H., & Choi, K.-C. (2018). Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(3), 1427-1435. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3732>

- Herskind, A. M., McGue, M., Holm, N. V., Sørensen, T. I. A., Harvald, B., & Vaupel, J. W. (1996). The heritability of human longevity : A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870–1900. *Human Genetics*, 97(3), 319-323. <https://doi.org/10.1007/BF02185763>
- Hess, D. T., & Stamler, J. S. (2012). Regulation by S-Nitrosylation of Protein Post-translational Modification. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4411-4418. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.285742>
- Holic, R., Xu, Y., Caldo, K. M. P., Singer, S. D., Field, C. J., Weselake, R. J., & Chen, G. (2018). Bioactivity and biotechnological production of puniceic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3537-3549. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8883-y>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, 14(10), R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Hou, Y., Ghosh, P., Wan, R., Ouyang, X., Cheng, H., Mattson, M. P., & Cheng, A. (2014). Permeability Transition Pore-Mediated Mitochondrial Superoxide Flashes Mediate an Early Inhibitory Effect of A $\beta$ 1–42 on Neural Progenitor Cell Proliferation. *Neurobiology of aging*, 35(5), 975-989. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.002>
- Houtkooper, R. H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moullan, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R. W., & Auwerx, J. (2013). Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*, 497(7450), 451-457. <https://doi.org/10.1038/nature12188>
- Howlander, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A. (2014). US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 106(5), dju055. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>
- Hsu, C.-Y., Chao, P.-Y., Hu, S.-P., & Yang, C.-M. (2013). The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*, 04(08), 1-8. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.48A001>
- Huang, J., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagy and Human Disease. *Cell Cycle*, 6(15), 1837-1849. <https://doi.org/10.4161/cc.6.15.4511>
- Huang, J.-D., Amaral, J., Lee, J. W., & Rodriguez, I. R. (2014). 7-Ketocholesterol-Induced Inflammation Signals Mostly through the TLR4 Receptor Both In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 9(7), e100985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100985>

- Impey, S., Smith, D. M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., & Storm, D. R. (1998). Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neuroscience*, *1*(7), 595-601. <https://doi.org/10.1038/2830>
- Ismail, T., Calcabrini, C., Diaz, A. R., Fimognari, C., Turrini, E., Catanzaro, E., Akhtar, S., & Sestili, P. (2016). Ellagitannins in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Toxins*, *8*(5), 151. <https://doi.org/10.3390/toxins8050151>
- Iuliano, L. (2011). Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*(6), 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006>
- Izuhara, Y., Yamaoka, N., Kodama, H., Dan, T., Takizawa, S., Hirayama, N., Meguro, K., van Ypersele de Strihou, C., & Miyata, T. (2010). A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *30*(5), 904-912. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.272>
- Jackson, G. R., & Owsley, C. (2003). Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurologic Clinics*, *21*(3), 709-728. [https://doi.org/10.1016/S0733-8619\(02\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0733-8619(02)00107-X)
- Jankovic, J., & Kapadia, A. S. (2001). Functional Decline in Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, *58*(10), 1611. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.10.1611>
- Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y., David, N., Baker, D. J., van Deursen, J. M., Campisi, J., & Elisseeff, J. H. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature medicine*, *23*(6), 775-781. <https://doi.org/10.1038/nm.4324>
- Jiang, X. C., Agellon, L. B., Walsh, A., Breslow, J. L., & Tall, A. (1992). Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *Journal of Clinical Investigation*, *90*(4), 1290-1295.
- Jiang, X., Holmes, C., & McVean, G. (2021). The impact of age on genetic risk for common diseases. *PLOS Genetics*, *17*(8), e1009723. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009723>

- Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2015). Alzheimer's Disease, *Drosophila melanogaster* and Polyphenols. In N. Vassallo (Éd.), *Natural Compounds as Therapeutic Agents for Amyloidogenic Diseases* (Vol. 863, p. 21-53). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18365-7_2)
- Jiramongkol, Y., & Lam, E. W.-F. (2020). FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 39(3), 681-709. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09883-w>
- Jo, D. S., & Cho, D.-H. (2019). Peroxisomal dysfunction in neurodegenerative diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 42(5), 393-406. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01131-2>
- Joulain, D. (2021). *Jasminum grandiflorum* flowers—Phytochemical complexity and its capture in extracts: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(5), 526-553. <https://doi.org/10.1002/ffj.3672>
- Jugreet, B. S., Suroowan, S., Rengasamy, R. R. K., & Mahomoodally, M. F. (2020). Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 89-105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025>
- Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 14(2), 141-153.
- Kar, S., Gupta, P., & Gupta, J. (2018a). Essential Oils: Biological Activity Beyond Aromatherapy. *Natural Product Sciences*, 24(3), 139. <https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.3.139>
- Kar, S., Gupta, P., & Gupta, J. (2018b). Essential Oils: Biological Activity Beyond Aromatherapy. *Natural Product Sciences*, 24(3), 139. <https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.3.139>
- Karagas, M. R., Greenberg, E. R., Spencer, S. K., Stukel, T. A., & Mott, L. A. (1999). Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. *International Journal of Cancer*, 81(4), 555-559. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990517\)81:4<555::AID-IJC9>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990517)81:4<555::AID-IJC9>3.0.CO;2-R)

- Kauffman, M. E., Kauffman, M. K., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 2(5), 361-370. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Kenyon, C. (2005). The Plasticity of Aging : Insights from Long-Lived Mutants. *Cell*, 120(4), 449-460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.002>
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461-464. <https://doi.org/10.1038/366461a0>
- Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504-512. <https://doi.org/10.1038/nature08980>
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2018). Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/nu11010039>
- Khan, S. S., Shah, S. J., Klyachko, E., Baldridge, A. S., Eren, M., Place, A. T., Aviv, A., Puterman, E., Lloyd-Jones, D. M., Heiman, M., Miyata, T., Gupta, S., Shapiro, A. D., & Vaughan, D. E. (2017). A null mutation in SERPINE1 protects against biological aging in humans. *Science Advances*, 3(11), eaao1617. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao1617>
- Khan, S. S., Singer, B. D., & Vaughan, D. E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell*, 16(4), 624-633. <https://doi.org/10.1111/acel.12601>
- Kim, J.-Y., & Park, J.-H. (2003). ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. *FEBS Letters*, 549(1-3), 94-98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00795-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00795-6)
- Kirkland, J. L., Tchkonina, T., Zhu, Y., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2017). The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(10), 2297-2301. <https://doi.org/10.1111/jgs.14969>
- Kisic, B., Miric, D., Zoric, L., Rasic, J. V., Grbic, R., Popovic, Lj. M., & Arsic, A. M. (2018). Xanthine oxidase activity in patients with age-related cataract associated with hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(5), e6129. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20176129>

- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, 17(1), 1-382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Ko, W., Kim, N., Lee, H., Woo, E.-R., Kim, Y.-C., Oh, H., & Lee, D.-S. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Compounds from *Cudrania tricuspidata* in HaCaT Human Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7472. <https://doi.org/10.3390/ijms22147472>
- Koistinen, V. M., Nordlund, E., Katina, K., Mattila, I., Poutanen, K., Hanhineva, K., & Aura, A.-M. (2017). Effect of Bioprocessing on the *In Vitro* Colonic Microbial Metabolism of Phenolic Acids from Rye Bran Fortified Breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(9), 1854-1864. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05110>
- Kotora, P., Šeršeň, F., Filo, J., Loos, D., Gregáň, J., & Gregáň, F. (2016). The Scavenging of DPPH, Galvinoxyl and ABTS Radicals by Imine Analogs of Resveratrol. *Molecules*, 21(1), 127. <https://doi.org/10.3390/molecules21010127>
- Kou, J., Kovacs, G. G., Höftberger, R., Kulik, W., Brodde, A., Forss-Petter, S., Hönigschnabl, S., Gleiss, A., Brügger, B., Wanders, R., Just, W., Budka, H., Jungwirth, S., Fischer, P., & Berger, J. (2011). Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 122(3), 271-283. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0836-9>
- Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., & Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function : The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 511-538. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073237>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death : Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 3-11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kroemer, G., Zamzami, N., & Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18(1), 44-51. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80014-X)

- Ksila, M., Ghzaïel, I., Yammine, A., Nury, T., Vejux, A., Vervandier-Fasseur, D., Latruffe, N., Prost-Camus, E., Meziane, S., Masmoudi-Kouki, O., Zarrouk, A., Ghraïri, T., & Lizard, G. (2023). Analysis of the mitochondrial status of murine neuronal N2a cells treated with resveratrol and synthetic isomeric resveratrol analogs : Aza-stilbenes. In *Molecular Nutrition and Mitochondria* (p. 195-211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90256-4.00023-0>
- Ksila, M., Vejux, A., Prost-Camus, E., Durand, P., Ghzaïel, I., Nury, T., Duprey, D., Meziane, S., Masmoudi-Kouki, O., Latruffe, N., Ghraïri, T., Prost, M., Lizard, G., & Vervandier-Fasseur, D. (2022). Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. *Molecules*, 27(15), 4713. <https://doi.org/10.3390/molecules27154713>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence : Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kunzelmann, K. (2016). Ion channels in regulated cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11-12), 2387-2403. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2208-z>
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell*, 127(6), 1109-1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>
- Lakey-Beitia, J., Burillo, A. M., La Penna, G., Hegde, M. L., & Rao, K. S. (2021). Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(s1), S335-S357. <https://doi.org/10.3233/JAD-200185>
- Laron, Z. (2004). Laron Syndrome (Primary Growth Hormone Resistance or Insensitivity) : The Personal Experience 1958–2003. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(3), 1031-1044. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031033>
- Latruffe, N., & Rifler, J.-P. (2013). Bioactive Polyphenols from Grapes and Wine Emphasized with Resveratrol. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6053-6063. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340002>



- Laurent, S., & Boutouyrie, P. (2015). The Structural Factor of Hypertension : Large and Small Artery Alterations. *Circulation Research*, 116(6), 1007-1021. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303596>
- Lavrik, I. N. (2014). Systems biology of death receptor networks : Live and let die. *Cell Death & Disease*, 5(5), e1259. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.160>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), 309-314. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., & Ruvkun, G. (2003). DAF-16 Target Genes That Control *C. elegans* Life-Span and Metabolism. *Science*, 300(5619), 644-647. <https://doi.org/10.1126/science.1083614>
- Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessède, G., Corcos, L., Gambert, P., Néel, D., & Lizard, G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biology and Toxicology*, 21(2), 97-114. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0141-2>
- Leonarduzzi, G., Vizio, B., Sottero, B., Verde, V., Gamba, P., Mascia, C., Chiarpotto, E., Poli, G., & Biasi, F. (2006). Early Involvement of ROS Overproduction in Apoptosis Induced by 7-Ketocholesterol. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4), 375-380. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.375>
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J., & Barberger-Gateau, P. (2007). Flavonoid Intake and Cognitive Decline over a 10-Year Period. *American Journal of Epidemiology*, 165(12), 1364-1371. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm036>
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2018). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia : Potential therapeutic targets to preserve the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, 134(Pt B), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.011>
- Li, Q., Zhao, H. F., Zhang, Z. F., Liu, Z. G., Pei, X. R., Wang, J. B., Cai, M. Y., & Li, Y. (2009). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience*, 159(4), 1208-1215. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.008>

- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 26087-26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Li, W., Ghosh, M., Eftekhari, S., & Yuan, X.-M. (2011). Lipid accumulation and lysosomal pathways contribute to dysfunction and apoptosis of human endothelial cells caused by 7-oxysterols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *409*(4), 711-716. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.071>
- Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., & Guan, F. (2021). Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, *22*(2), 165-187. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09910-5>
- Lim, S. S., Allen, K., Bhutta, Z. A., Dandona, L., Forouzanfar, M. H., Fullman, N., Gething, P. W., Goldberg, E. M., Hay, S. I., Holmberg, M., Kinfu, Y., Kutz, M. J., Larson, H. J., Liang, X., Lopez, A. D., Lozano, R., McNellan, C. R., Mokdad, A. H., Mooney, M. D., ... Murray, C. J. L. (2016). Measuring the health-related Sustainable Development Goals in 188 countries: A baseline analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, *388*(10053), 1813-1850. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31467-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31467-2)
- Lin, J., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2005). Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity Research*, *13*(6), 982-990. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.115>
- Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A., & Kenyon, C. (1997). *daf-16*: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *278*(5341), 1319-1322. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1319>
- Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P., & Franssen, M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*, 35. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00035>
- Liu, C., Marioni, R. E., Hedman, Å. K., Pfeiffer, L., Tsai, P.-C., Reynolds, L. M., Just, A. C., Duan, Q., Boer, C. G., Tanaka, T., Elks, C. E., Aslibekyan, S., Brody, J. A., Kühnel, B., Herder, C., Almlil, L. M., Zhi, D., Wang, Y., Huan, T., ... Levy, D. (2018). A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Molecular Psychiatry*, *23*(2), 422-433. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.192>

- Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye, G., & Revillard, J.-P. (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*, 21(3), 275-283. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210308>
- Lizard, G., Latruffe, N., & Vervandier-Fasseur, D. (2020). Aza- and Azo-Stilbenes : Bio-Isosteric Analogs of Resveratrol. *Molecules*, 25(3), 605. <https://doi.org/10.3390/molecules25030605>
- Lizard, G., Miguet, C., Gueldry, S., Monier, S., & Gambert, P. (1997). [Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist]. *Annales De Pathologie*, 17(1), 61-66.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquière, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L., & Gambert, P. (1999). Characterization and Comparison of the Mode of Cell Death, Apoptosis Versus Necrosis, Induced by 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol in the Cells of the Vascular Wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), 1190-1200. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.5.1190>
- Lizard, G., Rouaud, O., Demarquoy, J., Cherkaoui-Malki, M., & Iuliano, L. (2012). Potential Roles of Peroxisomes in Alzheimer's Disease and in Dementia of the Alzheimer's Type. *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(2), 241-254. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111163>
- Loerch, P. M., Lu, T., Dakin, K. A., Vann, J. M., Isaacs, A., Geula, C., Wang, J., Pan, Y., Gabuzda, D. H., Li, C., Prolla, T. A., & Yankner, B. A. (2008). Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. *PLoS ONE*, 3(10), e3329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003329>
- Lourida, I., Soni, M., Thompson-Coon, J., Purandare, N., Lang, I. A., Ukoumunne, O. C., & Llewellyn, D. J. (2013). Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia : A Systematic Review. *Epidemiology*, 24(4), 479-489. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182944410>
- Luchetti, F., Crinelli, R., Cesarini, E., Canonico, B., Guidi, L., Zerbinati, C., Di Sario, G., Zamai, L., Magnani, M., Papa, S., & Iuliano, L. (2017). Endothelial cells, endoplasmic reticulum stress and oxysterols. *Redox Biology*, 13, 581-587. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.014>

- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction : Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Madreiter-Sokolowski, C. T., Thomas, C., & Ristow, M. (2020). Interrelation between ROS and Ca<sup>2+</sup> in aging and age-related diseases. *Redox Biology*, 36, 101678. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101678>
- Mahesh, R., Ilangovan, P., Nongbri, D., & Suchiang, K. (2021). Probiotics Interactions and the Modulation of Major Signalling Pathways in Host Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Indian Journal of Microbiology*, 61(4), 404-416. <https://doi.org/10.1007/s12088-021-00961-3>
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3-15.
- Malaguarnera, L. (2019). Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients*, 11(5), 946. <https://doi.org/10.3390/nu11050946>
- Man, A., Santacroce, L., Iacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens : A Comparative Study. *Pathogens*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), S230-S242. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>
- Manini, T. M., & Clark, B. C. (2012). Dynapenia and Aging : An Update. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 67A(1), 28-40. <https://doi.org/10.1093/gerona/67a1010>
- Maor, I., Mandel, H., & Aviram, M. (1995). Macrophage Uptake of Oxidized LDL Inhibits Lysosomal Sphingomyelinase, Thus Causing the Accumulation of Unesterified Cholesterol–Sphingomyelin–Rich Particles in the Lysosomes : A Possible Role for 7-Ketocholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(9), 1378-1387. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.9.1378>

- Marel, A.-K., Lizard, G., Izard, J.-C., Latruffe, N., & Delmas, D. (2008). Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(5), 538-548. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700185>
- Markovinovic, A., Greig, J., Martín-Guerrero, S. M., Salam, S., & Paillusson, S. (2022). Endoplasmic reticulum–mitochondria signaling in neurons and neurodegenerative diseases. *Journal of Cell Science*, 135(3), jcs248534. <https://doi.org/10.1242/jcs.248534>
- Mazza, E., Ferro, Y., Pujia, R., Mare, R., Maurotti, S., Montalcini, T., & Pujia, A. (2021). Mediterranean Diet In Healthy Aging. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 25(9), 1076-1083. <https://doi.org/10.1007/s12603-021-1675-6>
- McGrattan, A. M., McGuinness, B., McKinley, M. C., Kee, F., Passmore, P., Woodside, J. V., & McEvoy, C. T. (2019). Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer's Disease. *Current Nutrition Reports*, 8(2), 53-65. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0271-4>
- Meaney, S. (2013). Epigenetic regulation of oxysterol formation. *Biochimie*, 95(3), 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.08.020>
- Mentzel, T. (2011). Sarcomas of the skin in the elderly. *Clinics in Dermatology*, 29(1), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.07.011>
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils : A Short Review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation* (p. 379-419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>
- Moilanen, T., & Nikkari, T. (1981). The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clinica Chimica Acta*, 114(1), 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90235-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90235-7)
- Monier, S., Samadi, M., Prunet, C., Denance, M., Laubriet, A., Athias, A., Berthier, A., Steinmetz, E., Jürgens, G., Nègre-Salvayre, A., Bessède, G., Lemaire-Ewing, S., Néel, D., Gambert, P., & Lizard, G. (2003). Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(3), 814-824. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00412-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00412-1)

- Moreira, E. F., Larrayoz, I. M., Lee, J. W., & Rodríguez, I. R. (2009). 7-Ketocholesterol Is Present in Lipid Deposits in the Primate Retina : Potential Implication in the Induction of VEGF and CNV Formation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(2), 523-532. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2373>
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *Journal of Lipid Research*, 5(4), 600-608. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40190-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40190-7)
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-Level Neuronal Expression of A $\beta$ 1–42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice : Synaptotoxicity without Plaque Formation. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 4050-4058. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000>
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2016). Oxysterols : From cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in Lipid Research*, 64, 152-169. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002>
- Nakamura, A., Kawakami, K., Kametani, F., Nakamoto, H., & Goto, S. (2010). Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction: Protein modifications in aging and calorie restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1197(1), 33-39. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05374.x>
- Namsi, A., Nury, T., Hamdouni, H., Yammine, A., Vejux, A., Vervandier-Fasseur, D., Latruffe, N., Masmoudi-Kouki, O., & Lizard, G. (2018). Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities : Resveratrol and Apigenin. *Diseases*, 6(3), 67. <https://doi.org/10.3390/diseases6030067>
- Namsi, Nury, Khan, Leprince, Vaudry, Caccia, Leoni, Atanasov, Tonon, Masmoudi-Kouki, & Lizard. (2019). Octadecaneuropeptide (ODN) Induces N2a Cells Differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-Dependent Pathway : Incidence on Peroxisome, Mitochondria, and Lipid Profiles. *Molecules*, 24(18), 3310. <https://doi.org/10.3390/molecules24183310>
- Navas-Madroñal, M., Rodriguez, C., Kassan, M., Fité, J., Escudero, J. R., Cañes, L., Martínez-González, J., Camacho, M., & Galán, M. (2019). Enhanced endoplasmic reticulum and mitochondrial stress in abdominal aortic aneurysm. *Clinical Science*, 133(13), 1421-1438. <https://doi.org/10.1042/CS20190399>

- Nelson, E. R., Wardell, S. E., Jasper, J. S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M. K., Carver, N. J., Pillai, R. V., Sullivan, P. M., Sondhi, V., Umetani, M., Geradts, J., & McDonnell, D. P. (2013). 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6162), 1094-1098. <https://doi.org/10.1126/science.1241908>
- Niu, W., & Qi, Y. (2015). Circulating Cholesteryl Ester Transfer Protein and Coronary Heart Disease : Mendelian Randomization Meta-Analysis. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(1), 114-121. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000748>
- Nury, T., Lizard, G., & Vejux, A. (2020). Lipids Nutrients in Parkinson and Alzheimer's Diseases : Cell Death and Cytoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2501. <https://doi.org/10.3390/ijms21072501>
- Nury, T., Samadi, M., Varin, A., Lopez, T., Zarrouk, A., Boumhras, M., Riedinger, J.-M., Masson, D., Vejux, A., & Lizard, G. (2013). Biological activities of the LXR $\alpha$  and  $\beta$  agonist, 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, and of its isomer, 4 $\alpha$ -hydroxycholesterol, on oligodendrocytes : Effects on cell growth and viability, oxidative and inflammatory status. *Biochimie*, 95(3), 518-530. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.11.013>
- Nury, T., Yammine, A., Ghzaïel, I., Sassi, K., Zarrouk, A., Brahmi, F., Samadi, M., Rup-Jacques, S., Vervandier-Fasseur, D., Pais de Barros, J. P., Bergas, V., Ghosh, S., Majeed, M., Pande, A., Atanasov, A., Hammami, S., Hammami, M., Mackrill, J., Nasser, B., ... Lizard, G. (2021). Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced oxiaoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils : Potential for the prevention of age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 68, 101324. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101324>
- Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.-M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., Prost, M., Moreau, T., Hammami, M., Delage-Mourroux, R., O'Brien, N. M., & Lizard, G. (2015). Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol : Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids*, 99, 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.003>
- Nury, T., Zarrouk, A., Yammine, A., Mackrill, J. J., Vejux, A., & Lizard, G. (2021). Oxiaoptophagy : A type of cell death induced by some oxysterols. *British Journal of Pharmacology*, 178(16), 3115-3123. <https://doi.org/10.1111/bph.15173>

- O'Brien, J. T., & Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *The Lancet*, 386(10004), 1698-1706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellscheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., von Zglinicki, T., & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*, 8, 15691. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>
- Oldfield, E., & Lin, F.-Y. (2012). Terpene Biosynthesis : Modularity Rules. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51(5), 1124-1137. <https://doi.org/10.1002/anie.201103110>
- Ormerod, M. G., Collins, M. K. L., Rodriguez-Tarduchy, G., & Robertson, D. (1992). Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. *Journal of Immunological Methods*, 153(1-2), 57-65. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90305-D](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90305-D)
- Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2012). Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Frontiers in Genetics*, 3, 297. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00297>
- Palma, M., Barbero, G. F., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., & Meireles, M. A. A. (2013). CHAPTER 2. Extraction of Natural Products : Principles and Fundamental Aspects. In M. A. Rostagno & J. M. Prado (Éds.), *Green Chemistry Series* (p. 58-88). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00058>
- Pandak, W. M., Ren, S., Marques, D., Hall, E., Redford, K., Mallonee, D., Bohdan, P., Heuman, D., Gil, G., & Hylemon, P. (2002). Transport of Cholesterol into Mitochondria Is Rate-limiting for Bile Acid Synthesis via the Alternative Pathway in Primary Rat Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48158-48164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205244200>
- Papaccio, F., D'Arino, A., Caputo, S., & Bellei, B. (2022). Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants*, 11(6), 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox11061121>
- Park, S. W., & Addis, P. B. (1985). HPLC Determination of C-7 Oxidized Cholesterol Derivatives in Foods. *Journal of Food Science*, 50(5), 1437-1441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10494.x>



- Paz, J. L., Levy, D., Oliveira, B. A., de Melo, T. C., de Freitas, F. A., Reichert, C. O., Rodrigues, A., Pereira, J., & Bydlowski, S. P. (2019). 7-Ketocholesterol Promotes Oxidative Phagocytosis in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cells*, 8(5), 482. <https://doi.org/10.3390/cells8050482>
- Peters, R., Beckett, N., Geneva, M., Tzekova, M., Lu, F. H., Poulter, R., Gainsborough, N., Williams, B., de Vernejoul, M.-C., Fletcher, A., & Bulpitt, C. (2009). Sociodemographic and lifestyle risk factors for incident dementia and cognitive decline in the HYVET. *Age and Ageing*, 38(5), 521-527. <https://doi.org/10.1093/ageing/afp094>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals : Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pikuleva, I. A. (2006). CHOLESTEROL-METABOLIZING CYTOCHROMES P450. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 513-520. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008789>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Ploplis, V. A. (2011). Effects of Altered Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression on Cardiovascular Disease. *Current drug targets*, 12(12), 1782-1789.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Polero, P., Rebollo-Seco, C., Adsuar, J. C., Pérez-Gómez, J., Rojo-Ramos, J., Manzano-Redondo, F., Garcia-Gordillo, M. Á., & Carlos-Vivas, J. (2021). Physical Activity Recommendations during COVID-19 : Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(1), 65. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010065>
- Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology*, 1(1), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001>

- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, *276*(5321), 2045-2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Puts, M. T. E., Lips, P., & Deeg, D. J. H. (2005). Static and dynamic measures of frailty predicted decline in performance-based and self-reported physical functioning. *Journal of Clinical Epidemiology*, *58*(11), 1188-1198. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2005.03.008>
- Pyo, I. S., Yun, S., Yoon, Y. E., Choi, J.-W., & Lee, S.-J. (2020). Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules*, *25*(20), 4649. <https://doi.org/10.3390/molecules25204649>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols : Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*(3), 586-621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quigley, H. A., & Broman, A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *The British Journal of Ophthalmology*, *90*(3), 262-267. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.081224>
- Ragot, K., Mackrill, J. J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., Barros, J.-P. P. de, Véjux, A., Riedinger, J.-M., Delmas, D., & Lizard, G. (2013). Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochemical Pharmacology*, *86*(1), 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.028>
- Ramirez, M., Izquierdo, I., Raseira, M., Zuanazzi, J., Barros, D., & Henriques, A. (2005). Effect of lyophilised berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacological Research*, *52*(6), 457-462. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.07.003>
- Rana, M., Cho, H.-J., Roy, T. K., Mirica, L. M., & Sharma, A. K. (2018). Azo-dyes based small bifunctional molecules for metal chelation and controlling amyloid formation. *Inorganica Chimica Acta*, *471*, 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.11.029>
- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods : Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*, *10*(1), 365-387. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>

- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 90(4), 1383-1435. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415-1430. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7)
- Rezig, L., Ghzaïel, I., Ksila, M., Yammine, A., Nury, T., Zarrouk, A., Samadi, M., Chouaïbi, M., Vejux, A., & Lizard, G. (2022). Cytoprotective activities of representative nutrients from the Mediterranean diet and of Mediterranean oils against 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cytotoxicity: Application to age-related diseases and civilization diseases. *Steroids*, 187, 109093. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109093>
- Ricciardi, C. A., & Gnudi, L. (2020). The endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in kidney disease: Implications for vascular growth factors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(22), 12910-12919. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15999>
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules*, 5(2), 545-589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Rodriguez, I. R., Clark, M. E., Lee, J. W., & Curcio, C. A. (2014). 7-ketocholesterol accumulates in ocular tissues as a consequence of aging and is present in high levels in drusen. *Experimental Eye Research*, 128, 151-155. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.009>
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., & Crozier, A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: An update. *Archives of Toxicology*, 88(10), 1803-1853. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Rodriguez-Roisin, R., Burgos, F., Roca, J., Barbera, J., Marrades, R., & Wagner, P. (1999). Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *European Respiratory Journal*, 14(6), 1454.2-1456. <https://doi.org/10.1183/09031936.99.14614549>

- Rogina, B., & Helfand, S. L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(45), 15998-16003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404184101>
- Román, G. C., Jackson, R. E., Gadhia, R., Román, A. N., & Reis, J. (2019). Mediterranean diet : The role of long-chain  $\omega$ -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. *Revue Neurologique*, *175*(10), 724-741. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.08.005>
- Rossi, R., Pastorelli, G., & Corino, C. (2013). Application of KRL test to assess total antioxidant activity in pigs : Sensitivity to dietary antioxidants. *Research in Veterinary Science*, *94*(2), 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.08.005>
- Rothe, G., & Valet, G. (1990). Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes With Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, *47*(5), 440-448. <https://doi.org/10.1002/jlb.47.5.440>
- Rowbotham, D. A. (2015). Epigenetic Changes in Aging and Age-related Disease. *Journal of Aging Science*, *03*(01). <https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000130>
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging : The critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129-5143. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.640>
- Russell, R. (1999). Atherosclerosis—An Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*. Jan 14;340(2):115-26. doi: 10.1056/NEJM199901143400207. PMID: 9887164.
- Russo, G. L., Spagnuolo, C., Russo, M., Tedesco, I., Moccia, S., & Cervellera, C. (2020). Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. *Biochemical Pharmacology*, *173*, 113719. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113719>
- Ryan, N. S., & Rossor, M. N. (2010). Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomarkers in medicine*, *4*(1), 99-112.

- Samadi, A., Sabuncuoglu, S., Samadi, M., Isikhan, S. Y., Chirumbolo, S., Peana, M., Lay, I., Yalcinkaya, A., & Bjørklund, G. (2020). A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 28(1), 110-136. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200316142659>
- Sassi, K., Nury, T., Zarrouk, A., Sghaier, R., Khalafi-Nezhad, A., Vejux, A., Samadi, M., Aissa-Fennira, F. B., & Lizard, G. (2019). Induction of a non-apoptotic mode of cell death associated with autophagic characteristics with steroidal maleic anhydrides and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol on glioma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 191, 105371. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.020>
- Satoh, A., Brace, C. S., Rensing, N., Clifton, P., Wozniak, D. F., Herzog, E. D., Yamada, K. A., & Imai, S. (2013). Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell metabolism*, 18(3), 416-430. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.013>
- Savelev, S. U., Okello, E. J., & Perry, E. K. (2004). Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, 18(4), 315-324. <https://doi.org/10.1002/ptr.1451>
- Scandalios, J. G. (2002). Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol. Jun 18;3(7):REVIEWS1019*. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-reviews1019. Epub 2002 Jun 18. PMID: 12184812; PMCID: PMC139384.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Mayeux, R., & Stern, Y. (2007). Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology*, 69(11), 1084-1093. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277320.50685.7c>
- Schaefer, E. J., Geller, A. S., & Endress, G. (2019). The biochemical and genetic diagnosis of lipid disorders: *Current Opinion in Lipidology*, 30(2), 56-62. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000590>
- Schmidt-Dannert, C. (2014). Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. In J. Schrader & J. Bohlmann (Éds.), *Biotechnology of Isoprenoids* (Vol. 148, p. 19-61). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_283](https://doi.org/10.1007/10_2014_283)
- Scholey, A. B., French, S. J., Morris, P. J., Kennedy, D. O., Milne, A. L., & Haskell, C. F. (2010). Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *Journal of Psychopharmacology*, 24(10), 1505-1514. <https://doi.org/10.1177/0269881109106923>

- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755-1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2008). The peroxisome: Still a mysterious organelle. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), 421-440. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0396-9>
- Schroepfer, G. J. (2000). Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiological Reviews*, 80(1), 361-554. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.361>
- Seals, D. R., Jablonski, K. L., & Donato, A. J. (2011). Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical science (London, England: 1979)*, 120(9), 357-375. <https://doi.org/10.1042/CS20100476>
- Setzer, W. N. (2009). Essential Oils and Anxiolytic Aromatherapy. *Natural Product Communications*, 4(9), 1934578X0900400. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400928>
- Sghaier, R., Nury, T., Leoni, V., Caccia, C., Pais De Barros, J.-P., Cherif, A., Vejux, A., Moreau, T., Limem, K., Samadi, M., Mackrill, J. J., Masmoudi, A. S., Lizard, G., & Zarrouk, A. (2019). Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 194, 105432. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105432>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Denys, P., & Kowalczyk, E. (2012). The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains. *Microbial Drug Resistance*, 18(2), 137-148. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0080>
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., Dudkowska, M., Krzystyniak, A., Mosieniak, G., Wesierska, M., & Włodarczyk, J. (2021). Cellular Senescence in Brain Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 646924. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646924>
- Silva, P., Sureda, A., Tur, J. A., Andreoletti, P., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2019). How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean diet, towards alterations during the aging process? *Free Radical Research*, 53(sup1), 1101-1112. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1614176>

- Singh Chouhan, K. B., Tandey, R., Sen, K. K., Mehta, R., & Mandal, V. (2019). Critical analysis of microwave hydrodiffusion and gravity as a green tool for extraction of essential oils: Time to replace traditional distillation. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.006>
- Sköld, M., Karlberg, A.-T., Matura, M., & Börje, A. (2006). The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—Air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.028>
- Slavin, J. L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21(3), 411-418. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.08.018>
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables1. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506-516. <https://doi.org/10.3945/an.112.002154>
- Sottero, B., Rossin, D., Poli, G., & Biasi, F. (2018). Lipid Oxidation Products in the Pathogenesis of Inflammation-related Gut Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 25(11), 1311-1326. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170619104105>
- Sozen, T., Ozisik, L., & Calik Basaran, N. (2017). An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology*, 4(1), 46-56. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>
- Spires, T. L., & Hyman, B. T. (2005). Transgenic Models of Alzheimer's Disease : Learning from Animals. *NeuroRx*, 2(3), 423-437.
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 42. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Strappazon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G. M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., & Cecconi, F. (2015). AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death & Differentiation*, 22(3), 419-432. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.139>

- Strasser, B., & Fuchs, D. (2015). Role of physical activity and diet on mood, behavior, and cognition. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 21(3), 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.npbr.2015.07.002>
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for Extracting Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (p. 31-38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M.-F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 0, 17-32. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.004>
- Sudo, R., Sato, F., Azechi, T., & Wachi, H. (2015). 7-Ketocholesterol-induced lysosomal dysfunction exacerbates vascular smooth muscle cell calcification via oxidative stress. *Genes to Cells*, 20(12), 982-991. <https://doi.org/10.1111/gtc.12301>
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2013). Lipid Peroxidation Triggers Neurodegeneration : A Redox Proteomics View into the Alzheimer Disease Brain. *Free radical biology & medicine*, 62, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.027>
- Szabadkai, G., Simoni, A. M., Bianchi, K., De Stefani, D., Leo, S., Wieckowski, M. R., & Rizzuto, R. (2006). Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(5-6), 442-449. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.002>
- Taner, B. & Zeynep, E. (2021). Fatty acid composition and antioxidant capacity of pomegranate seed oil. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 015(02), 103-110. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.15.2.0126>
- Tanu, B., & Harpreet, K. (2016). Benefits of essential oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(6):143-149



- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.-P., Yin, C.-M., & Garofalo, R. S. (2001). A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science*, 292(5514), 107-110. <https://doi.org/10.1126/science.1057987>
- Tayal, A. H., Tian, M., Kelly, K. M., Jones, S. C., Wright, D. G., Singh, D., Jarouse, J., Brillman, J., Murali, S., & Gupta, R. (2008). Atrial fibrillation detected by mobile cardiac outpatient telemetry in cryptogenic TIA or stroke. *Neurology*, 71(21), 1696-1701. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000325059.86313.31>
- Terlecky, S. R., Koepke, J. I., & Walton, P. A. (2006). Peroxisomes and Aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(12), 1749-1754. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.017>
- Terzibasi, E., Valenzano, D. R., & Cellerino, A. (2007). The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Experimental Gerontology*, 42(1-2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.039>
- Testa, G., Rossin, D., Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2018). Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie*, 153, 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.006>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29615-29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Thomas, C. J., Mirza, R. G., & Gill, M. K. (2021). Age-Related Macular Degeneration. *Medical Clinics of North America*, 105(3), 473-491. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2021.01.003>
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549-554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils : Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Tosti, V., Bertozzi, B., & Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet : Metabolic and Molecular Mechanisms. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(3), 318-326. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx227>

- Trichopoulou, A., & Vasilopoulou, E. (2000). Mediterranean diet and longevity. *British Journal Of Nutrition*, 84(6), 205-209. <https://doi.org/10.1079/096582197388554>
- Trist, B. G., Hare, D. J., & Double, K. L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, 18(6), e13031. <https://doi.org/10.1111/acel.13031>
- Trivedi, P. C., Bartlett, J. J., & Pulinilkunnil, T. (2020). Lysosomal Biology and Function : Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells*, 9(5), 1131. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Tsang, T. S. M., Petty, G. W., Barnes, M. E., O'Fallon, W. M., Bailey, K. R., Wiebers, D. O., Sicks, J. D., Christianson, T. J. H., Seward, J. B., & Gersh, B. J. (2003). The prevalence of atrial fibrillation in incident stroke cases and matched population controls in Rochester, Minnesota. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(1), 93-100. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00500-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00500-X)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils : A Systematic Review. *Nutrients*, 11(11), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van der Horst, A., & Burgering, B. M. T. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 440-450. <https://doi.org/10.1038/nrm2190>

- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., & Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria. *Cell*, *91*(5), 627-637. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80450-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80450-X)
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439-446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Vanleerberghe, P., De Witte, N., Claes, C., Schalock, R. L., & Verté, D. (2017). The quality of life of older people aging in place : A literature review. *Quality of Life Research*, *26*(11), 2899-2907. <https://doi.org/10.1007/s11136-017-1651-0>
- Vejux, A., Abed-Vieillard, D., Hajji, K., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Ghosh, S., Nury, T., Yammine, A., Zaibi, M., Mihoubi, W., Bouchab, H., Nasser, B., Grosjean, Y., & Lizard, G. (2020). 7-Ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol : In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical Pharmacology*, *173*, 113648. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113648>
- Vejux, A., & Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases : Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(3), 153-170. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006>
- Vejux, A., Malvitte, L., & Lizard, G. (2008). Side effects of oxysterols : Cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *41*(7), 545-556. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000700001>
- Vejux, A., Samadi, M., & Lizard, G. (2011). Contribution of Cholesterol and Oxysterols in the Physiopathology of Cataract : Implication for the Development of Pharmacological Treatments. *Journal of Ophthalmology*, *2011*, 471947. <https://doi.org/10.1155/2011/471947>
- Velarde, M. C., & Demaria, M. (2016). Targeting Senescent Cells : Possible Implications for Delaying Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, *62*(5), 513-518. <https://doi.org/10.1159/000444877>
- Vellas, B., Pahor, M., Manini, T., Rooks, D., Guralnik, J. M., Morley, J., Studenski, S., Evans, W., Asbrand, C., Fariello, R., Pereira, S., Rolland, Y., Van Kan, G. A., Cesari, M., Chumlea, Wm. C., & Fielding, R. (2013). Designing pharmaceutical trials for sarcopenia in frail older adults : eu/us task force recommendations. *The journal of nutrition, health & aging*, *17*(7), 612-618. <https://doi.org/10.1007/s12603-013-0362-7>

- Vermond, P., Vancoppenolle, M., Dierge, E., Mignolet, E., Cuvelier, G., Knoops, B., Page, M., Debier, C., Feron, O., & Larondelle, Y. (2021). Punicic Acid Triggers Ferroptotic Cell Death in Carcinoma Cells. *Nutrients*, *13*(8), 2751. <https://doi.org/10.3390/nu13082751>
- Vijg, J., & Suh, Y. (2005). Genetics of Longevity and Aging. *Annual Review of Medicine*, *56*(1), 193-212. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104617>
- Wanders, R. J. A. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, *98*, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.022>
- Wanders, R. J. A., Baes, M., Ribeiro, D., Ferdinandusse, S., & Waterham, H. R. (2023). The physiological functions of human peroxisomes. *Physiological Reviews*, *103*(1), 957-1024. <https://doi.org/10.1152/physrev.00051.2021>
- Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2006). Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 295-332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. (2014). Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Biochimica et biophysica acta*, *1842*(8), 1240-1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>
- Wang, Y., Sharpless, N., & Chang, S. (2013). P16INK4a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(10), 4489-4501. <https://doi.org/10.1172/JCI69574>
- Weinreb, R. N., Aung, T., & Medeiros, F. A. (2014). The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma. *JAMA*, *311*(18), 1901-1911. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>
- Williams, C. M., El Mohsen, M. A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L. T., Ellis, J. A., Whiteman, M., & Spencer, J. P. E. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radical Biology and Medicine*, *45*(3), 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.008>
- Williams, N. C., & O'Neill, L. A. J. (2018). A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*, 141. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00141>

- Wisniewski, T., & Drummond, E. (2020). APOE-amyloid interaction : Therapeutic targets. *Neurobiology of disease*, 138, 104784. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104784>
- Woods, N. K., & Padmanabhan, J. (2012). Neuronal Calcium Signaling and Alzheimer's Disease. In Md. S. Islam (Éd.), *Calcium Signaling* (Vol. 740, p. 1193-1217). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_54](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_54)
- World Health Organization. (2015). *World health statistics 2015*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/170250>
- Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1633-1646. <https://doi.org/10.1111/bph.13492>
- Xu, J., Fu, Q., Chen, X., & Yao, K. (2020). Advances in pharmacotherapy of cataracts. *Annals of Translational Medicine*, 8(22), 1552. <https://doi.org/10.21037/atm-20-1960>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., ... Kirkland, J. L. (2018). Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age. *Nature medicine*, 24(8), 1246-1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, 10(11), 1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
- Yamine, A., Namsi, A., Vervandier-Fasseur, D., Mackrill, J. J., Lizard, G., & Latruffe, N. (2021). Polyphenols of the Mediterranean Diet and Their Metabolites in the Prevention of Colorectal Cancer. *Molecules*, 26(12), 3483. <https://doi.org/10.3390/molecules26123483>
- Yamine, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Greige-Gerges, H., Auezova, L., & Lizard, G. (2020). Prevention of 7-Ketocholesterol-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death with Major Nutrients (Polyphenols,  $\omega$ 3 and  $\omega$ 9 Unsaturated Fatty Acids) of the Mediterranean Diet on N2a Neuronal Cells. *Molecules*, 25(10), 2296. <https://doi.org/10.3390/molecules25102296>

- Yammine, A., Zarrouk, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Mackrill, J. J., Greige-Gerges, H., Auezova, L., & Lizard, G. (2020). Prevention by Dietary Polyphenols (Resveratrol, Quercetin, Apigenin) Against 7-Ketocholesterol-Induced Oxidative Phagocytosis in Neuronal N2a Cells : Potential Interest for the Treatment of Neurodegenerative and Age-Related Diseases. *Cells*, 9(11), 2346. <https://doi.org/10.3390/cells9112346>
- Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., & Zhou, R. (2013). Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity*, 38(6), 1154-1163. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.015>
- Yang, C., diIorio, P., Jurczyk, A., O'Sullivan-Murphy, B., Urano, F., & Bortell, R. (2013). Pathologic Endoplasmic Reticulum Stress Mediated by the IRE1 Pathway Contributes to Pre-insulinitic Beta Cell Apoptosis in a Virus Induced Rat Model of Type 1 Diabetes. *Diabetologia*, 56(12), 2638-2646. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3044-4>
- Yang, R., Dong, H., Jia, S., & Yang, Z. (2022). Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 24(7), 1219-1230. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02770-y>
- Yeh, C.-J. G., Hsi, B.-L., & Page Faulk, W. (1981). Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *Journal of Immunological Methods*, 43(3), 269-275. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90174-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90174-5)
- Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., & Mirsadeghi, S. (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>
- Zarrouk, A., Ben Salem, Y., Hafsa, J., Sghaier, R., Charfeddine, B., Limem, K., Hammami, M., & Majdoub, H. (2018). 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie*, 153, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.027>

- Zarrouk, A., Martine, L., Grégoire, S., Nury, T., Meddeb, W., Camus, E., Badreddine, A., Durand, P., Namsi, A., Yammine, A., Nasser, B., Mejri, M., Bretillon, L., Mackrill, J. J., Cherkaoui-Malki, M., Hammami, M., & Lizard, G. (2019). Profile of Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols and Polyphenols in Mediterranean Oils (Argan Oils, Olive Oils, Milk Thistle Seed Oils and Nigella Seed Oil) and Evaluation of their Antioxidant and Cytoprotective Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 25(15), 1791-1805. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190705192902>
- Zarrouk, A., Riedinger, J.-M., Ahmed, S. H., Hammami, S., Chaabane, W., Debbabi, M., Ben Ammou, S., Rouaud, O., Frih, M., Lizard, G., & Hammami, M. (2015). Fatty Acid Profiles in Demented Patients : Identification of Hexacosanoic Acid (C26:0) as a Blood Lipid Biomarker of Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(4), 1349-1359. <https://doi.org/10.3233/JAD-142046>
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N., & Lizard, G. (2014). Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews*, 18, 148-162. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006>
- Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H. I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.-M., Hammami, M., & Lizard, G. (2012). Induction of Mitochondrial Changes Associated with Oxidative Stress on Very Long Chain Fatty Acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-Treated Human Neuronal Cells (SK-NB-E). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2012/623257>
- Zermane, A., Larkeche, O., Meniai, A.-H., Crampon, C., & Badens, E. (2016). Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO<sub>2</sub> using response surface methodology. *Comptes Rendus Chimie*, 19(4), 538-543. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.08.011>
- Zgorzynska, E., Dziedzic, B., & Walczewska, A. (2021). An Overview of the Nrf2/ARE Pathway and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9592. <https://doi.org/10.3390/ijms22179592>
- Zhang, L.-X., Li, C.-X., Kakar, M. U., Khan, M. S., Wu, P.-F., Amir, R. M., Dai, D.-F., Naveed, M., Li, Q.-Y., Saeed, M., Shen, J.-Q., Rajput, S. A., & Li, J.-H. (2021). Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112164. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164>
- Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against Skin Aging. *Cell Transplantation*, 27(5), 729-738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>

- Zhang, Y., Zou, B., Wang, K., Pan, Y., Liang, H., Yi, X., & Wang, H. (2012). Antioxidant activities and transition metal ion chelating studies of some hydroxyl Schiff base derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7), 1341-1346. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9648-7>
- Zhou, D.-D., Luo, M., Huang, S.-Y., Saimaiti, A., Shang, A., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2021). Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 9932218. <https://doi.org/10.1155/2021/9932218>
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., ... Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron*, 44(4), 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>



---

# ANNEXES

---

## Annexe 1 :

### Étapes pré-analytiques d'analyse des acides gras

#### Saponification

- Culots secs repris dans 200 µL PBS.
- Ajouter 25 µL Mix SI AGT S22-002 (mélange d'acides gras deutérés préparés sur la plateforme (n° lot S22-002)).
- Ajouter 2,4 mL EtOH/BHT (Ethanol/Hydroxytoluène butylé).
- Ajouter 120 µL KOH (Hydroxyde de potassium) 10 M.
- Agiter pendant 5 minutes.
- Incuber pendant 45 minutes à 56°C.

#### Extraction des acides gras

- Ajouter 1 mL HCl (1,2 M) + 6 mL d'Hexane.
- Agiter pendant 5 minutes.
- Centrifuger pendant 5 minutes.
- Récupérer la phase hexanique.
- Sécher.

#### Dérivation

- Ajouter 50 µL PFBBr (pentafluorobenzyl bromide : réactif permettant de dériver la fonction carboxylique des acides gras) + 50 µL DIPEA (N, N-Diisopropylethylamine : réactif facilitant la dérivation au PFBBr) + 1/10<sup>e</sup> ACN (acétonitrile).
- Incuber pendant une 30 minutes à 37°C.
- Sécher sous flux d'azote.
- Ajouter 1 mL d'eau + 2 mL d'Hexane
- Agiter pendant 5 minutes.

- Centrifuger pendant 5 minutes.
- Récupérer la phase hexanique.
- Suspendre dans 100  $\mu$ L d'Hexane pour analyse GC-MS
- Analyse GC-MS (Agilent-El).

## Annexe 2 :

### Etapes pré-analytiques d'analyse des oxystérols

#### Saponification

- Culots secs repris dans 200  $\mu$ L PBS.
- Ajouter 10  $\mu$ L Mix SI Oxy 22-143 (mélange de standards internes deutérés d'oxystérols préparés spécifiquement (ici pour la série d'analyse 22-143)).
- Ajouter 2,4 mL EtOH/BHT (Ethanol/Hydroxytoluène butylé).
- Ajouter 120  $\mu$ L KOH (Hydroxyde de potassium) 10M.
- Agiter pendant 5 minutes.
- Incuber pendant 45 minutes à 56°C.

#### Extraction des stérols

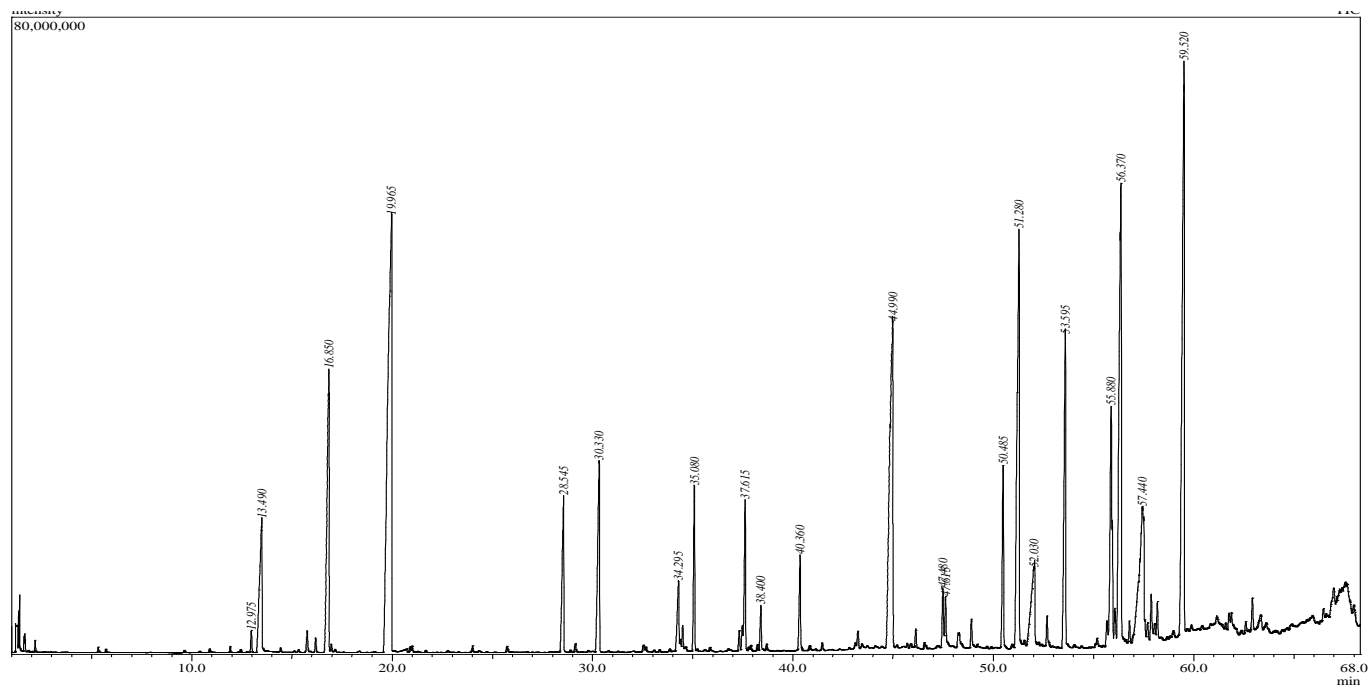
- Ajouter 800  $\mu$ L d'eau + 6 mL d'Hexane.
- Agiter pendant 5 minutes.
- Centrifuger pendant 5 minutes.
- Récupérer la phase hexanique.
- Sécher.

#### Dérivation

- Ajouter 100  $\mu$ L de BSTFA/TMCS (N, O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide/Triméthylchlorosilane
- Incuber pendant une heure à 80°C.
- Sécher sous flux d'azote.
- Suspendre dans 50  $\mu$ L d'Hexane.
- Transférer dans des tubes en verre afin d'être injectés dans le chromatographe GC-MS.
- Analyse GC-MS (ISQ)

## Annexes 3 :

## Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de jasmin

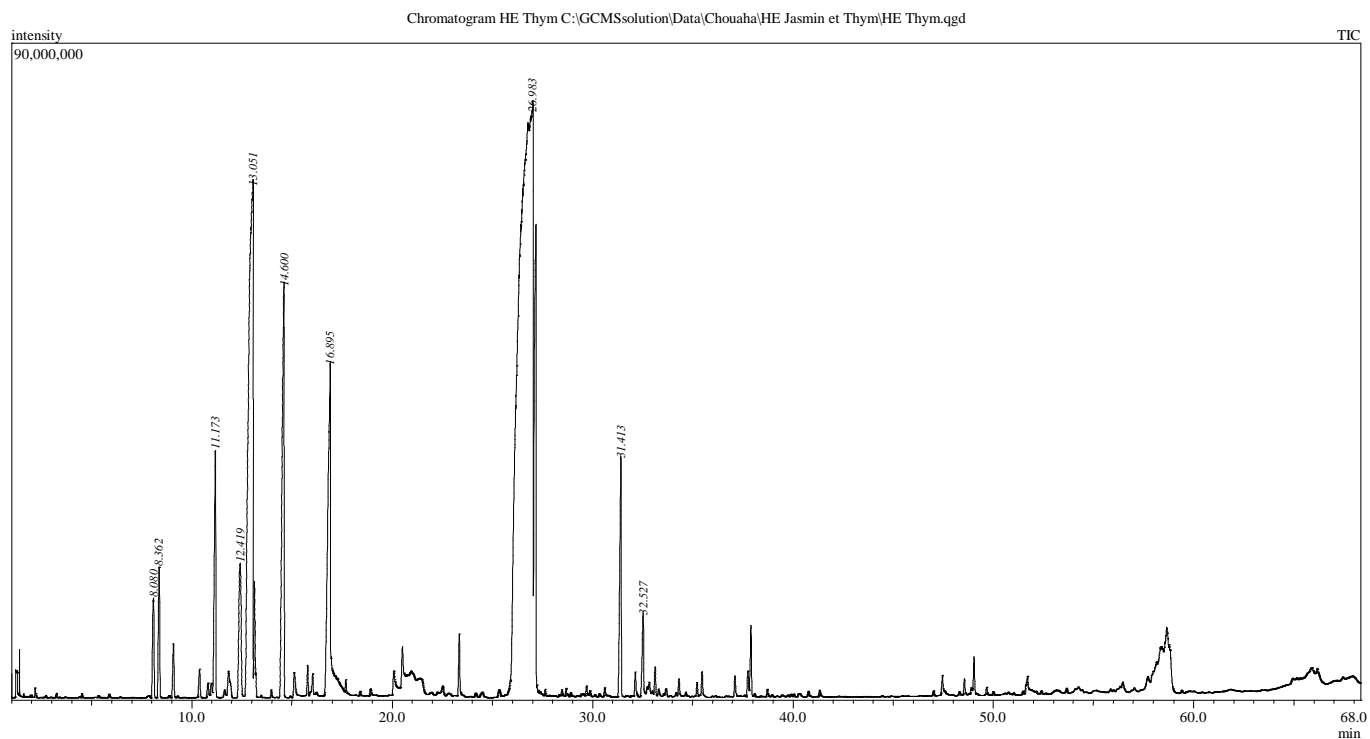


## Tableau des constituants de l'huile essentielle de jasmin

Peak Report TIC							
Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Name
1	12.974	10362192	0.22	2685450	0.47	3.86	D-Limonene 95%
2	13.490	147038186	3.09	16327712	2.87	9.01	Benzyl alcohol 98%
3	16.848	252432753	5.31	34749224	6.11	7.26	Linalool 98%
4	19.964	757907091	15.94	54993304	9.68	13.78	Benzyl acetate 95%
5	28.546	111341926	2.34	19215842	3.38	5.79	Eugenol 98%
6	30.329	159071238	3.34	23837787	4.19	6.67	cis-Jasmone 96%
7	34.293	64440213	1.36	8931611	1.57	7.21	Jasmine lactone 96%
8	35.079	88758758	1.87	19999422	3.52	4.44	.alpha.-Farnesene 97%
9	37.615	97645041	2.05	18175744	3.20	5.37	cis-Hexenyl-3-benzoate 97%
10	38.402	26199802	0.55	5655090	0.99	4.63	Methyl N-acetylanthranilate 97%
11	40.358	60156213	1.26	11637483	2.05	5.17	Methyl jasmonate 94%
12	44.989	483914420	10.18	41348718	7.28	11.70	Benzyl Benzoate 91%
13	47.482	38726566	0.81	7518882	1.32	5.15	Neophytadiene 96%
14	47.615	34615784	0.73	6647606	1.17	5.21	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- 94%
15	50.487	110804842	2.33	22660942	3.99	4.89	Methyl palmitate 96%
16	51.280	404558887	8.51	51003295	8.97	7.93	
17	52.029	150164186	3.16	10303090	1.81	14.57	Palmitic acid 94%
18	53.593	228202618	4.80	38181035	6.72	5.98	trans-Geranylgeraniol 93%

## Annexe 4 :

## Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de thym



## Tableau des constituants de l'huile essentielle de thym

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Name	
1	8.018	7.875	8.130	50077368	1.12	9828078	2.65	5.10	.alpha.-Thujene 97%	
2	8.300	8.130	8.420	60122665	1.34	12304912	3.32	4.89	.alpha.-Pinene 97%	
3	11.099	10.955	11.305	123578666	2.76	25935886	7.00	4.76	.beta.-Myrcene 96%	
4	12.336	12.145	12.465	100996211	2.25	16215883	4.38	6.23	(+) -4-Carene 95%	
5	12.933	12.560	12.960	835967323	18.65	66675020	18.01	12.54	p-Cymene 85%	
6	13.019	12.960	13.175	48318727	1.08	10395640	2.81	4.65	D-Limonene 94%	
7	14.498	14.270	16.460	301609604	6.73	47915422	12.94	6.29	.gamma.-Terpinene 95%	
8	16.777	16.460	16.820	303645257	6.78	38651011	10.44	7.86	Linalool 98%	
9	26.681	25.775	26.750	2205676787	49.21	56901618	15.37	38.76	Thymol 90%	
10	26.842	26.720	26.885	299661337	6.69	53043246	14.33	5.65	p-Cymen-7-ol 85%	
11	31.283	31.095	31.460	111572341	2.49	23957722	6.47	4.66	Caryophyllene 97%	
12	32.357	32.210	32.525	40575548	0.91	8446068	2.28	4.80	Thymoquinol 89%	
				4481801834	100.00	370270506	100.00			

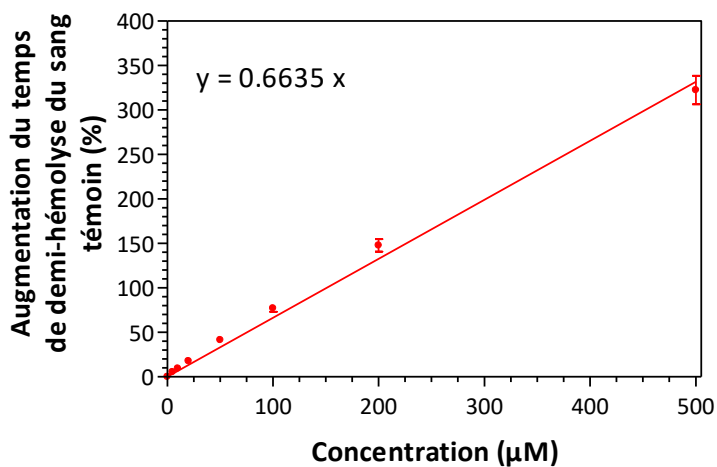
## Annexe 5 :

## Test KRL

<b>Pouvoir antioxydant des huiles essentielles (test KRL)</b>				
<b>Augmentation du temps de demi-hémolyse du sang témoin (%)</b>				
Concentrations* (mg/L)	HE Thym		HE Jasmin	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	59,56	2,31	11,74	0,41
2	86,71	3,24	23,23	1,46
5	115,69	3,12	52,05	2,58
10	147,74	5,68	89,37	4,04
<b>20</b>	<b>194,62</b>	<b>6,90</b>	<b>127,77</b>	<b>5,58</b>
50	259,09	6,15	186,88	6,51
100	283,37	4,93	229,37	3,55

<b>Pouvoir antioxydant des huiles essentielles</b>				
<b>Equivalentes mg de Trolox/g et mg d'acide gallique/g</b>				
Concentrations* 20 mg/L	HE Thym		HE Jasmin	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD
<b>Eq. mg Trolox/g HE</b>	3676	215	2412	94
<b>Eq. mg ac.Gallique/g HE</b>	1741	14	1143	22

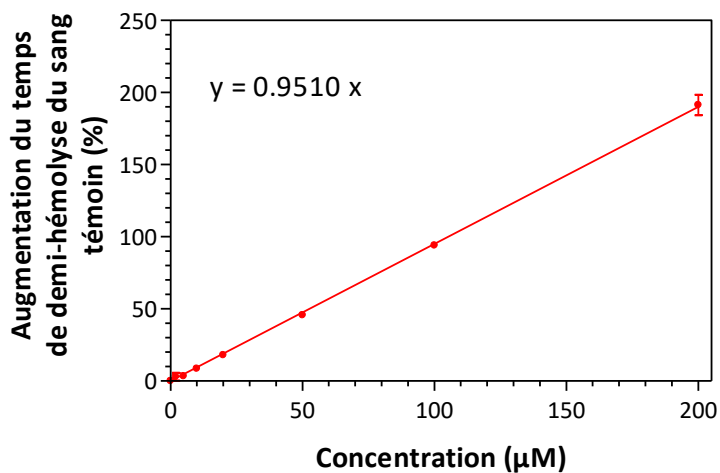
**TEST KRL**  
**Efficacité antioxydante du Trolox**



• Trolox

Conc ( $\mu\text{M}$ )	Trolox		
	Y	SD	N
0	0.00	0.000	3
5	5.50	0.770	3
10	9.59	1.030	3
20	17.73	0.580	3
50	41.36	0.660	3
100	77.16	3.830	3
200	147.75	7.010	3
500	322.48	16.020	3

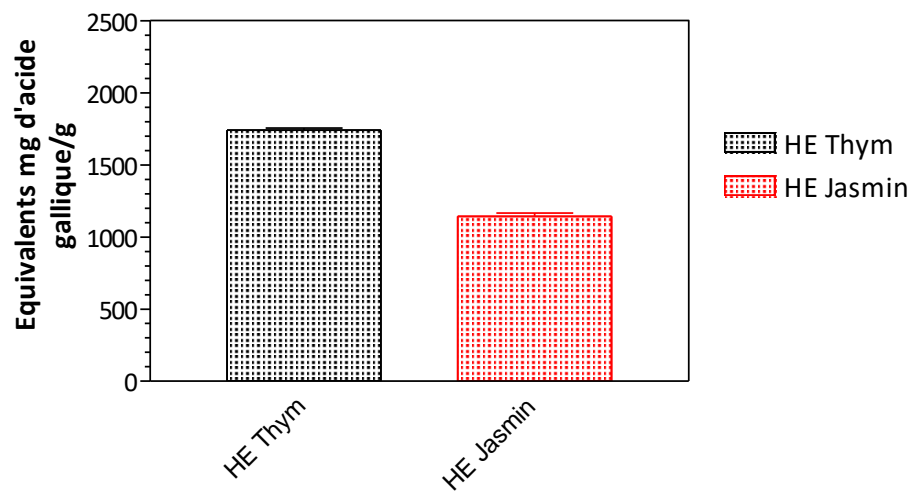
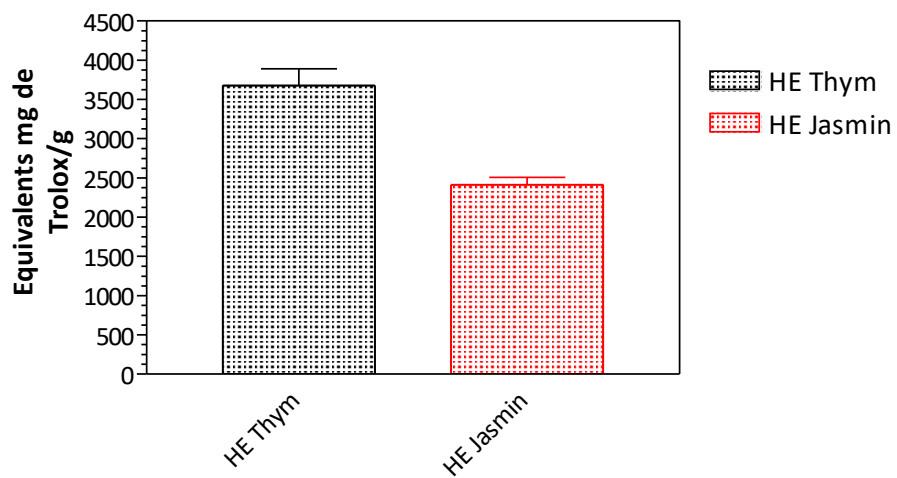
**TEST KRL**  
**Efficacité antioxydante de l'acide gallique**



• Acide gallique

Conc ( $\mu\text{M}$ )	Acide Gallique		
	Y	SD	N
0	0.00	0.000	3
2	2.94	2.700	3
5	3.43	0.400	3
10	8.63	0.980	3
20	18.03	0.710	3
50	45.77	1.960	3
100	94.06	1.610	3
200	191.32	7.110	3





## Annexe 6 : Publications associées aux travaux de thèse



Article

## Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells

Mohamed Ksila <sup>1,2</sup>, Anne Vejux <sup>1</sup> , Emmanuelle Prost-Camus <sup>3</sup> , Philippe Durand <sup>3</sup>, Imen Ghzaïel <sup>1,4</sup> , Thomas Nury <sup>1</sup> , Dorian Duprey <sup>5</sup>, Smail Meziane <sup>4</sup>, Olfa Masmoudi-Kouki <sup>2</sup>, Norbert Latruffe <sup>1</sup> , Taoufik Ghraïri <sup>2</sup>, Michel Prost <sup>3</sup> , Gérard Lizard <sup>1,\*</sup> and Dominique Vervandier-Fasseur <sup>5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA7270/Inserm, University Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; mohamedksila44@gmail.com (M.K.); anne.vejux@u-bourgogne.fr (A.V.); imenghzaïel93@gmail.com (I.G.); thomas.nury@u-bourgogne.fr (T.N.); norbert.latruffe@u-bourgogne.fr (N.L.)
  - <sup>2</sup> Laboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology and Valorisation of Biomolecules, (LR18ES03), Department of Biology, Faculty of Sciences, University Tunis El Manar, Tunis 2092, Tunisia; olfa.masmoudi@fst.utm.tn (O.M.-K.); taoufik.ghraïri@fst.utm.tn (T.G.)
  - <sup>3</sup> Laboratoire Spiral, 21560 Couternon, France; camusprost@hotmail.fr (E.P.-C.); laraspiral@wanadoo.fr (P.D.); michelprost.spiral@wanadoo.fr (M.P.)
  - <sup>4</sup> Institut Européen des Antioxydants (IEA), 1B, rue Victor de Lespinats, 54230 Neuves-Maisons, France; smeziiane@ie-antioxydants.com
  - <sup>5</sup> Team OCS, Institute of Molecular Chemistry of University of Burgundy (ICMUB UMR CNRS 6302), University of Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; Dorian\_Duprey@etu.u-bourgogne.fr
- \* Correspondence: gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G.L.); dominique.vervandier-fasseur@u-bourgogne.fr (D.V.-F.); Tel.: +33-380-396-256 (G.L.); +33-380-399-036 (D.V.-F.); Fax: +33-380-396-250 (G.L.)



**Citation:** Ksila, M.; Vejux, A.; Prost-Camus, E.; Durand, P.; Ghzaïel, I.; Nury, T.; Duprey, D.; Meziane, S.; Masmoudi-Kouki, O.; Latruffe, N.; et al. Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 4713. <https://doi.org/10.3390/molecules27154713>

Academic Editor: René Csuk

Received: 23 June 2022

Accepted: 21 July 2022

Published: 23 July 2022

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



**Copyright:** © 2022 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:** *Trans*-resveratrol is a natural polyphenol showing numerous biological properties, especially anti-tumoral and antioxidant activity. Among numerous resveratrol derivatives, aza-stilbenes, which bear an imine bound, show interesting biological activities. In the present study, we synthesized a series of imine analogs of *trans*-resveratrol (seven aza-stilbenes) following an easy and low-cost procedure of green chemistry. The toxicity of synthesized aza-stilbenes, which is currently unknown, was evaluated on murine neuronal N2a cells, comparatively to *trans*-resveratrol, by considering: cell density evaluated by staining with sulforhodamine 101; esterase activity, which is a criteria of cell viability, by staining with fluorescein diacetate; and transmembrane mitochondrial potential, which is known to decrease during cell death, by staining with DiOC<sub>6</sub>(3) using flow cytometry. In addition, the antioxidant activity was quantified with the KRL (Kit Radicaux Libres) assay, the DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay. The PAOT (Pouvoir Antioxydant Total) score was also used. The aza-stilbenes provide different cytotoxic and antioxidant activities, which are either higher or lower than those of *trans*-resveratrol. Based on their cytotoxic and antioxidant characteristics, all synthesized aza-stilbenes are distinguished from *trans*-resveratrol.

**Keywords:** *trans*-resveratrol; aza-stilbenes synthesis; antioxidant activity; cytotoxicity; murine neuronal N2a cells

### 1. Introduction

Polyphenolic compounds present in numerous plants exhibit a large variety of biological properties [1]. Among them, polyphenolic stilbenoids occupy an important place in the field of health-beneficial molecules. In this series, the most-studied molecule is the *trans*-resveratrol (RSV) or 3,4',5-trihydroxystilbene, a phytoalexin, present in numerous edible plants such as peanuts, red fruit including grapes and therefore in red wine.

RSV is implied in the French paradox [2,3] and in the Mediterranean diet [4,5]. The interest aroused by RSV since the 1990s [6] is especially due to its pleiotropic antifungal

and therapeutic activities in the treatment of inflammatory diseases and some cancer. Unfortunately, the weak bioavailability of RSV does not allow to consider it as a perfect therapeutic molecule [7]. Indeed, RSV is rapidly metabolized and degraded [5]. Numerous synthetic derivatives of RSV were elaborated to improve and target more of some biological activities and to enhance their water solubility. Different ways to modify RSV while keeping the initial stilbenoid skeleton were reported as transformation of phenolic functions into ester or ether functions [8–10], or by addition of different substituents on the aromatic rings [11–14], or by changing a phenyl with an aromatic heterocycle [15] or an aromatic organometallic cycle [13]. Moreover, the C = C bond may be replaced with an isosteric fragment as an aromatic heterocycle [16], or with a C = N bond or a N = N bond to provide aza-stilbenes **AZA-ST** [17] and azo-stilbenes **AZO-ST** [18], respectively (Figure 1).

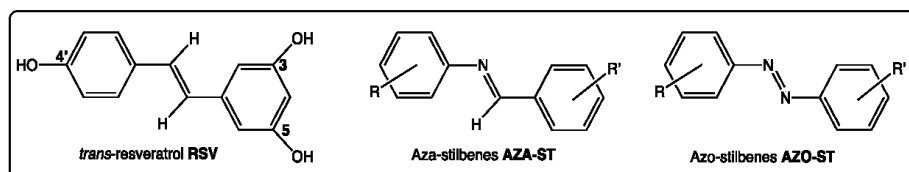


Figure 1. Structure of *trans*-resveratrol RSV, aza-stilbenes AZA-ST and azo-stilbenes AZO-ST.

Recently, biological activities of these series of bio-isosteric resveratrol derivatives were reviewed, especially the antioxidant properties of **AZA-ST** [19]. Regarding resveratrol, the replacement of the C = C bond by the isosteric fragment C = N gives noteworthy behaviors to these derivatives. In addition, the presence of one or more hydroxyl groups and their position on aromatic cycles bring more or less strong antioxidant properties to aza-stilbenes. In this report, seven aza-stilbenes **1a–1g** were synthesized by using previously described methods, which were improved by including criteria of green chemistry [20–25] (Figure 2), and we evaluated their toxicity on murine neuronal N2a cells, comparatively to *trans*-resveratrol, by taking into account the following parameters: cell density evaluated by staining with sulforhodamine 101 (SR101); esterase activity, which is a criteria of cell viability, by staining with fluorescein diacetate (FDA); transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ), which is known to decrease during cell death, by staining with 3,3'-dihexyloxycarbocyanine Iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)) and flow cytometry; antioxidant activity was quantified with the KRL (Kit Radicaux Libres) assay as previously described [26,27] as well as with the DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay [28] and the ferric reducing antioxidant power FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay [29,30]. The PAOT (Pouvoir Antioxydant Total) score was also used [31].

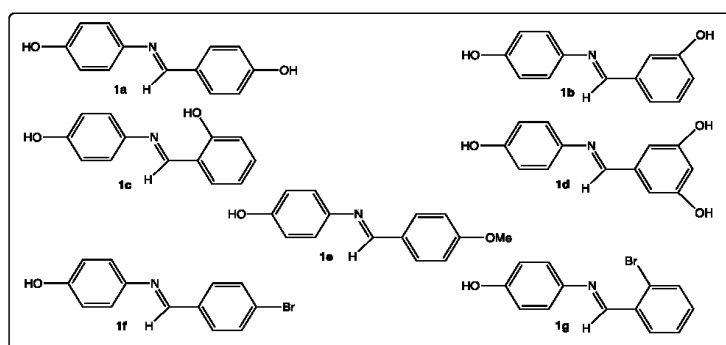


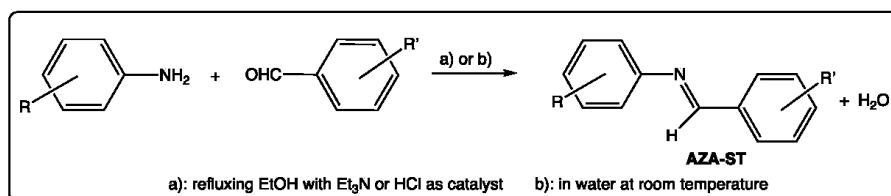
Figure 2. Structure of aza-stilbenes **1a–1g**.

As it is assumed that aza-stilbenes would be less degraded than *trans*-resveratrol both in vitro and in vivo, their use for therapeutic purposes could be considered, provided that these molecules do not exhibit a greater toxicity than that of *trans*-resveratrol while having retained the antioxidant properties of this one.

## 2. Results and Discussion

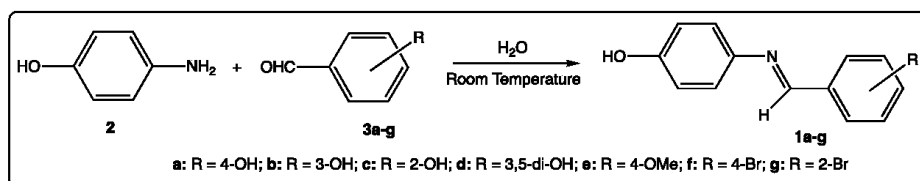
### 2.1. Chemistry

Aza-stilbenes may be easily synthesized by a one-step condensation reaction between aromatic aldehydes and primary aromatic amines (Scheme 1). The commercially available reactants often bear hydroxyl, methoxyl, methyl or halogenated atoms as substituents, which makes it possible to obtain a large series of aza-stilbenes. The reaction between an equimolar amount of aromatic aldehydes and primary aromatic amines may be carried out in refluxing EtOH with a catalytic amount of triethylamine [20] or of HCl [21,22]. However, aza-stilbenes may be obtained by stirring an equimolar amount of aromatic aldehydes and primary aromatic amines in a small volume of water as solvent at room temperature during 0.5 to 3 h. The products are isolated by filtration with high yields [23]. In this report, we chose this cost-effective method [24,25] that we have improved by introducing several criteria of green chemistry.



Scheme 1. Synthetic methods for obtaining aza-stilbenes AZA-ST.

It has been shown that the antioxidant activities of *trans*-resveratrol (further defined as resveratrol) are often due to an OH group in position 4' [32,33]. Thus, to keep a comparison setting between resveratrol and aza-stilbenes, AZA-ST 1a–g were prepared from 4-hydroxyaniline (2) and different aromatic aldehydes 3a–g as described in Scheme 2. Compounds 1a–1e have been reported by different authors [20,21]. Among them, Kotora et al. have characterized aza-stilbenes 1a–d, especially by NMR spectroscopy [25]. In this report, we have carried out <sup>1</sup>H, COSY and NOESY NMR experiments of all compounds to assign chemical shifts of aromatic protons as well as <sup>13</sup>C, jmod, HSQC and HMBC NMR experiments to highlight coupling between the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nucleus.



Scheme 2. Synthesis of AZA-ST 1a–g.

Towards stilbenes synthesis, preparation of AZA-ST may be carried out in a one-step sustainable reaction. Indeed, synthesis of hydroxystilbenes derived from resveratrol requires several steps, including protection and deprotection reactions [11,13]. In addition, stilbenes are isolated under a mixture of both *E* and *Z* isomers, whose proportions depend on the method used (Heck or Wittig method) [13]. In contrast, in the case of AZA-ST, only the *E* isomers are isolated because the *Z* configuration is not thermally favored [34].

## 2.2. Cytotoxicity

Some experiments were realized to determine and compare the cytotoxic activities of aza-stilbenes **1a** to **1g** to resveratrol in a range of concentration from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$  (48 h). In this range of concentration, resveratrol is known to have differentiating activities on N2a cells at low concentrations (6.25 and 12.5  $\mu\text{M}$ , 48 h) [35] and to induce cell death at concentrations higher than 12.5  $\mu\text{M}$  [36]. In the present study, three complementary assays (SR101, FDA and DiOC<sub>6</sub>(3) assays) were used to determine the cytotoxic activities of aza-stilbenes **1a** to **1g** comparatively to resveratrol. Among these different assays, SR101 gives information on cell density, which reflects cell growth and cell adhesion. With the different aza-stilbenes used, as well as with resveratrol, the decrease of fluorescence observed with the SR101 assay corresponds to a decrease of cell density, which is related with a loss of cell adhesion associated with an increasing of floating cells (dead cells) in the culture medium (Figure 3).

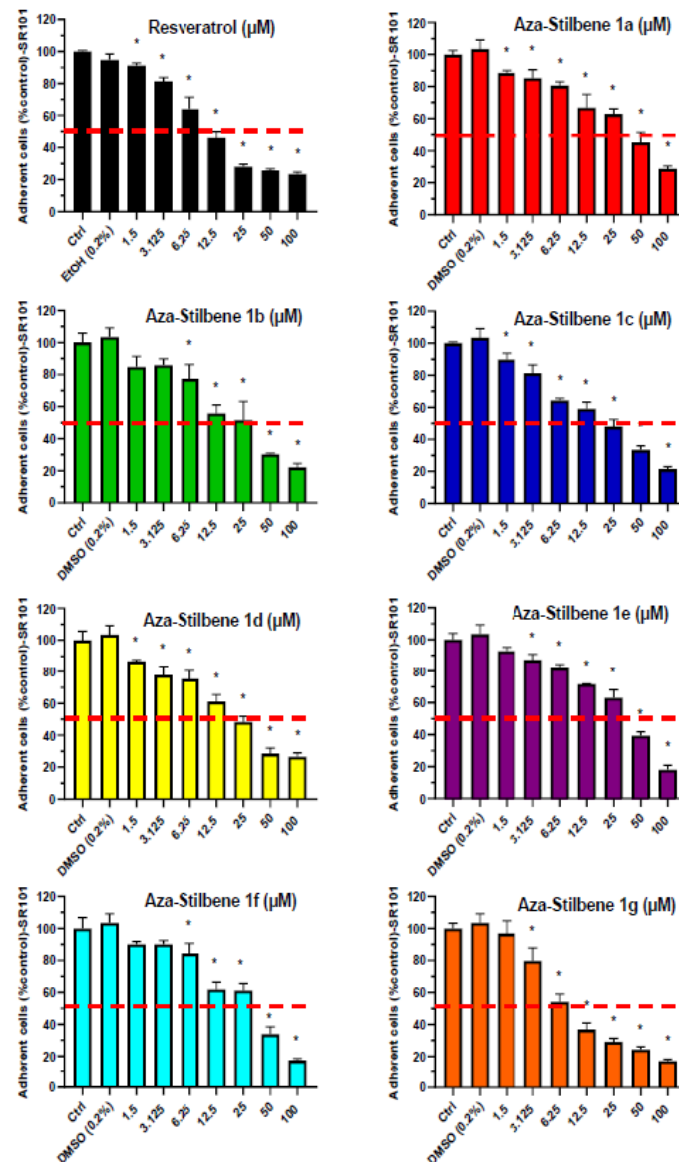
Based on the SR101 test, the cytotoxicity of aza-stilbenes and resveratrol were in the following range of order: resveratrol > aza-stilbene **1g** > aza-stilbene **1b** > aza-stilbene **1d** > aza-stilbene **1c** > aza-stilbene **1a** > aza-stilbene **1d** > aza-stilbene **1e** (Figure 3). The FDA assay indicates a loss of esterase activity, obtained in the same range of concentrations as the loss of cell adhesion observed with SR101 (Figure 4). This supports that aza-stilbenes and resveratrol-induced cell death trigger plasma-membrane damages; this agrees with the concentration-dependent decrease of esterase activity observed with the different aza-stilbenes studied and with resveratrol.

As it is well established on different cell types, including N2a cells, that resveratrol triggers mitochondrial dysfunctions in a concentration-dependent manner [36], the effects of aza-stilbenes have been studied at the mitochondrial level and compared with those of resveratrol. With the used of DiOC<sub>6</sub>(3), which allows quantifying the  $\Delta\Psi\text{m}$ , a more or less pronounced loss of  $\Delta\Psi\text{m}$  was observed with the different aza-stilbenes since 12.5  $\mu\text{M}$  (Figure 5).

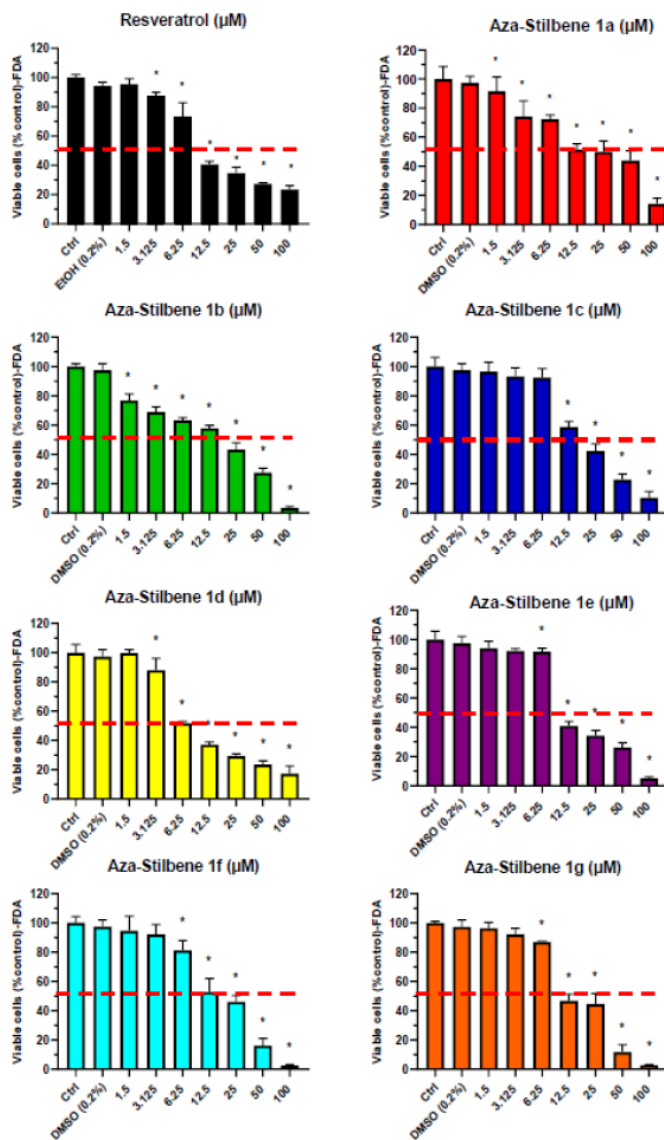
Our data show important differences of toxicity from one aza-stilbene to another. In addition, based on the different cytotoxic assays used, the most cytotoxic aza-stilbenes are aza-stilbene **1g** and aza-stilbene **1b** (Table 1). The toxicity of these two aza-stilbenes evokes the toxicity observed with resveratrol, whereas the toxicities of the other aza-stilbenes (**1a**, **1c**, **1d**, **1e** and **1f**) are lower than with resveratrol.

**Table 1.** IC50 values of resveratrol and aza-stilbenes **1a** to **1g** obtained with the SR101, FDA et DiOC<sub>6</sub>(3) assays. Sulforhodamine 101 (SR101, evaluation of cell density), fluorescein diacetate (FDA, esterase activity/evaluation of cell viability) and DiOC<sub>6</sub>(3) (measurement of transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi\text{m}$ )). Aza-stilbenes were compared with resveratrol (*trans*-resveratrol).

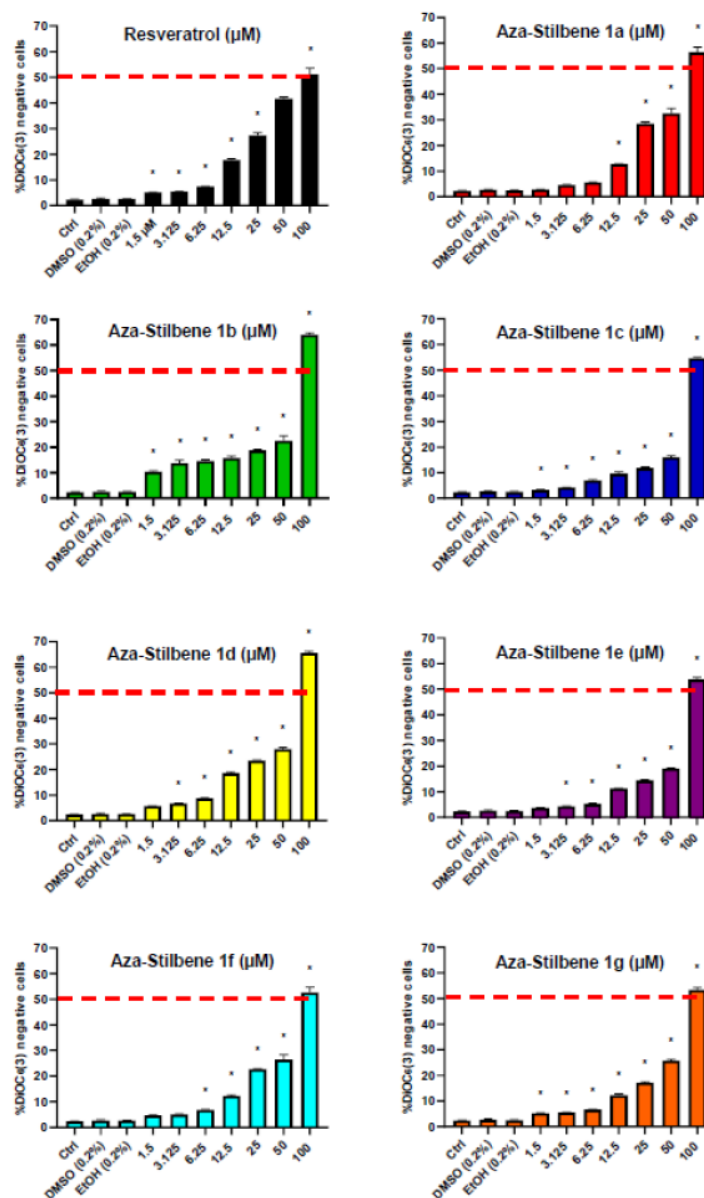
	Molecular Formula	Molecular Weight (g/mol)	IC50 $\mu\text{M}$ (SR101)	IC50 $\mu\text{M}$ (FDA)	IC50 $\mu\text{M}$ (DiOC <sub>6</sub> (3))
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228.24	~12.5	6.25 < IC50 < 12.5	100
Aza-Stilbene 1a	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	25 < IC50 < 50	12.5	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1b	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	12.5	12.5 < IC50 < 25	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1c	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	25	12.5 < IC50 < 25	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1d	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	229.228	25	6.25	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1e	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	227.254	25 < IC50 < 50	6.25 < IC50 < 12.5	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1f	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276.11	25 < IC50 < 50	12.5	50 < IC50 < 100
Aza-Stilbene 1g	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276.11	6.25	~12.5	50 < IC50 < 100



**Figure 3.** Evaluation with the sulforhodamine 101 (SR101) assay of the effects of resveratrol and aza-stilbenes **1a** to **1g** on cell density. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or aza-stilbenes **1a** to **1g** in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$ . Cell density evaluated with SR101 reflects the quantity of adherent cells. The dotted red line makes it possible to evaluate the value of the concentration or the range of concentrations reducing the number of adherent cells by 50% (IC50). Data are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), Resveratrol (*trans*-resveratrol) or aza-stilbenes **1a** to **1g**-treated cells; Student's *t* test: \*  $p < 0.05$  or less.



**Figure 4.** Evaluation with the fluorescein diacetate (FDA) assay of the effects of resveratrol and aza-stilbenes **1a** to **1g** on cell viability. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or aza-stilbenes **1a** to **1g** in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$ . The dotted red line makes it possible to evaluate the value of the concentration, or the range of concentrations, reducing cell viability by 50% (IC50). Data are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), Resveratrol (*trans*-resveratrol) or aza-stilbenes **1a** to **1g**-treated cells; Student's *t* test: \*  $p < 0.05$  or less.



**Figure 5.** Flow cytometric evaluation of transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) with DiOC6(3) under treatment with resveratrol and aza-stilbenes **1a** to **1g**. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or aza-stilbenes **1a** to **1g** in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$ . Data are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), Resveratrol (*trans*-resveratrol) or aza-stilbenes **1a** to **1g**-treated cells; Student's *t* test; \*  $p < 0.05$  or less.



In addition, as resveratrol is also known for its antioxidant properties, the antioxidant activities of aza-stilbenes **1a** to **1g** were determined with the KRL assay and compared with resveratrol. All the aza-stilbenes considered have higher antioxidant activities than resveratrol (Figure 6). The highest antioxidant activities were observed with aza-stilbenes **1d** and **1b**; the antioxidant activities of aza-stilbenes (**1a**, **1c**, **1e**, **1f** and **1g**) were similar and lower (Figure 6).

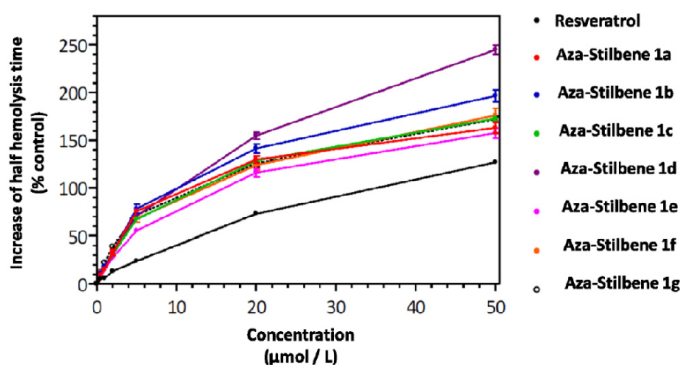


Figure 6. Quantification of the antioxidant activity of resveratrol and aza-stilbenes **1a** to **1g** with the KRL test.

Data obtained with the KRL assay, which integrates the ability of an antioxidant molecule to neutralize reactive oxygen species and to prevent the peroxidation of membrane lipids, were associated with two conventional antioxidant assays: the DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. The data obtained with the DPPH assay, which only take in consideration the ability of an antioxidant molecule to neutralize a radical, allow to distinguish the different aza-stilbenes and the resveratrol. With the DPPH assay (at the exception of aza-stilbene **1c** and **1g**), as observed with the KRL test, the aza-stilbenes have higher antioxidant activities than resveratrol (Table 2).

Table 2. Antioxidant activities of resveratrol and aza-stilbenes.

Antioxidant Activities of Resveratrol and Aza-Stilbenes 1a–1g Evaluated with Different Assays				
Compounds	KRL (20 µM)	DPPH (25 µM)	FRAP (25 µM)	PAOT Score (25 µM)
Resveratrol	72.81 ± 1.10	32.76 ± 6.40	10.41 ± 0.05	19.39 ± 1.06
Aza-stilbene 1a	129.74 ± 3.92	35.07 ± 1.75	10.52 ± 0.05	42.65 ± 0.78
Aza-stilbene 1b	141.29 ± 4.65	38.84 ± 1.90	10.02 ± 0.04	34.11 ± 0.18
Aza-stilbene 1c	128.38 ± 2.03	5.51 ± 2.25	12.32 ± 0.06	13.34 ± 0.54
Aza-stilbene 1d	154.63 ± 3.50	47.84 ± 2.35	11.05 ± 0.07	56.49 ± 0.59
Aza-stilbene 1e	116.06 ± 4.40	48.55 ± 2.40	10.34 ± 0.05	ND
Aza-stilbene 1f	123.78 ± 5.16	53.69 ± 2.65	10.41 ± 0.05	ND
Aza-stilbene 1g	125.76 ± 3.39	17.23 ± 0.85	10.18 ± 0.04	ND

Aza-stilbenes and resveratrol were used either at 20 or 25 µM. No differences were observed between resveratrol and aza-stilbenes with the FRAP assays. According to the KRL assay, DPPH assay and PAOT, various antioxidant properties of aza-stilbenes and resveratrol were identified. The KRL assay is expressed as increase of haemolysis time (% of control); DPPH assay: % inhibition; FRAP assay: µMol Fe<sup>2+</sup> reduced per mM of resveratrol and aza-stilbenes; PAOT score: (PAOT Score/L) of analyzed sample. Data are means of 1–2 independent experiments realized in triplicate. N.D.: not determined.

As polyphenols are known for their chelating properties towards various metals, including Fe [37], it is supposed that the antioxidant and chelating properties of polyphenols, and probably of aza-stilbenes, could interfere when the FRAP assay is used. For this reason, in agreement with this hypothesis, it was unable to discriminate the antioxidant properties of resveratrol and aza-stilbenes with this method.

The PAOT score, which has been recently described [25], was also used and compared with the KRL and DPPH assay. The PAOT score is based on the measurement of the scavenging properties of antioxidants with the use of an electrochemical method. The data obtained with resveratrol and few aza-stilbenes also allow to distinguish the molecules tested. Based on the simultaneous use of the KRL, DPPH and PAOT assay, it is considered that the aza-stilbenes 1a and 1d have the highest antioxidant activities, whereas aza-stilbene 1c has the lowest antioxidant characteristics (Table 1).

It is important to underline that some differences were observed from one antioxidant assay to another, since the different assays used to evaluate the antioxidant activities measure different parameters.

As aza-stilbenes have antioxidant activities, it will be further of interest to evaluate their differentiating activities on N2a cells to determine their neurotrophic effect (antioxidant activity + differentiating activity on nerve cells) [35,38]. This can have important applications in the context of regenerative medicine. In addition, as resveratrol has also been shown to induce the differentiation of murine myoblasts C2C12 in myotubes [39], there is also an interest to further evaluate the ability of aza-stilbenes to act on the differentiation of skeletal muscle cells. This can also have important applications in the context of aging for the treatment of sarcopenia, which is characterized by a decrease of the muscular mass in the elderly [40].

### 3. Conclusions

Comparatively to resveratrol (*trans*-resveratrol), the aza-stilbenes synthesized have either higher or lower cytotoxic and antioxidant activities. Our data show that all aza-stilbenes synthesized are distinguishable based on their cytotoxic and antioxidant activities. Thus, the aza-stilbenes produced constitute a new series of molecules for which it is therefore justified to further specify their pharmacological activities on different *in vitro* and *in vivo* disease models for which the *trans*-resveratrol has shown some effects such as some cancer, chronic inflammatory diseases and age-related diseases (cardiovascular diseases, ocular diseases and neurodegenerative diseases).

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemistry

All reagents and solvents are purchased from commercial suppliers and used without further purifications. 4-aminophenol [123-30-8], 3-hydroxybenzaldehyde [100-83-4], salicylaldehyde [90-02-8] and 3,5-dihydroxybenzaldehyde [26153-38-8] are purchased from Alfa Aesar (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA); 4-hydroxybenzaldehyde [123-08-0] and *para*-anisaldehyde [123-11-5] are purchased from Acros Organics (Geel/Antwerp, Belgium); 2-bromobenzaldehyde [6630-33-7] was purchased from Aldrich and 4-bromobenzaldehyde [1122-91-4] is purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium).

The characterization of the products was established at the “Chemical Analysis Platform of Molecular Synthesis University of Burgundy (PACSMUB)”. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Thermo LTQ-Orbitrap XL with ESI source. FTIR spectra were obtained on a Bruker Alfa spectrometer (diamond ATR, Kontich, Belgium) in the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (126 MHz) NMR spectra were recorded on Bruker 500 MHz spectrometer. The chemical shifts are given in ppm relative to DMSO  $d_6$  ( $^1\text{H}$ , 3.33 and 2.50 ppm and  $^{13}\text{C}$  39.52 ppm). Coupling constants  $J$  are given in Hz. Multiplicities are given as follows: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q) and multiplet (m). “CPh” designates protons and carbons of the aromatic ring bound to the

carbon atom of imine, and “NPh” designates protons and carbons of the aromatic ring bound to the nitrogen atom of imine (Figure 7).

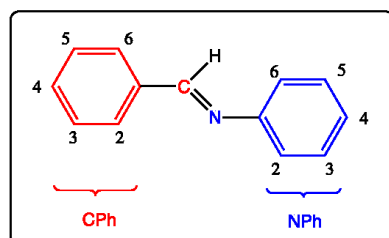


Figure 7. Symbolism for analysis of NMR data.

*General procedure for the synthesis of (hydroxyphenyliminomethyl)phenols 1a–1g.*

4-aminophenol (**2**) (1 g, 9.17 mmol) was stirred with an equimolar amount of an aromatic aldehyde **3a–g** in 20 mL of distilled water, during 4 to 5 h at room temperature (20 °C). The solid product obtained **1a–1g** was filtered, washed with water, air dried and recrystallized from ethanol, acetone, ethyl acetate or acetonitrile.

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and the HMBC spectra of aza-stilbenes **1a** to **1g** are shown in Supplementary Materials Figures S1 and S2, respectively.

*4-((4-Hydroxyphenyl)imino)methylphenol (1a):* recrystallized from acetone; yield 63%; m.p. 212–214 °C. IR: 3485.4 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 1639.3 ( $\nu/\text{C}=\text{N}$ ), 1239.5 ( $\nu/\text{C-O}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.00 (s, 1H, CPh OH), 9.38 (s, 1H, NPh OH), 8.43 (s, 1H, CH = N), 7.72 (d, 2H,  $J$  = 8.61 Hz, CPh 2,6-H), 7.11 (d, 2H,  $J$  = 8.72 Hz, NPh 2,6-H), 6.85 (d, 2H,  $J$  = 8.58 Hz, CPh 3,5-H), 6.77 (d, 2H,  $J$  = 8.72 Hz, NPh 3,5-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 160.1 (CPh C-1), 156.9 (C = N), 155.7 (NPh C-1), 143.2 (NPh C-4), 130.1 (CPh C-2,6), 127.9 (CPh C-4), 122.1 (NPh C-2,6), 115.6 (NPh C-3,5), 115.5 (CPh C-3,5). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 214.0861 [M + H] $^+$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_2^+$ , 214.0863, found 214.0861.

*3-((4-Hydroxyphenyl)imino)methylphenol (1b):* no recrystallization; yield 87%; m.p. 193–195 °C. IR: 3296.5 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 1622.2 ( $\nu/\text{C}=\text{N}$ ), 1214.7 ( $\nu/\text{C-O}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.61 (s, 1H, CPh OH), 9.47 (s, 1H, NPh OH), 8.50 (s, 1H, CH = N), 7.32 (m, 1H, CPh 4-H), 7.28 (s, 1H, CPh 6-H), 7.27 (m, 1H, CPh 2-H), 7.17 (d, 2H,  $J$  = 8.70 Hz, NPh 2,6-H), 6.90–6.86 (m, 1H, CPh 5-H), 6.79 (d, 2H,  $J$  = 8.70 Hz, NPh 3,5-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 157.6 (CPh C-1), 157.2 (C = N), 156.2 (NPh C-1), 142.6 (NPh C-4), 137.8 (CPh C-3), 129.7 (CPh C-6), 122.5 (NPh C-2,6), 119.9 (CPh C-2), 118.1 (CPh C-5), 115.7 (NPh C-3,5), 113.9 (CPh C-4). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 214.0862 [M + H] $^+$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_2^+$ , 214.0863, found 214.0862.

*2-((4-Hydroxyphenyl)imino)methylphenol (1c):* no recrystallization; yield 11%; m.p. 138–139 °C. IR: 3392.1 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 3280.5 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 1613.8 ( $\nu/\text{C}=\text{N}$ ), 1209.1 ( $\nu/\text{C-O}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13.41 (s, 1H, CPh OH), 9.67 (s, 1H, NPh OH), 8.90 (s, 1H, CH = N), 7.59 (dd, 1H,  $J$  = 7.67, 1.62 Hz, CPh 6-H), 7.37 (m, 1H, CPh 5-H), 7.32 (d, 2H,  $J$  = 8.77 Hz, NPh 2,6-H), 6.96 (d, 1H,  $J$  = 7.40 Hz, CPh 3-H), 6.93 (d, 1H,  $J$  = 8.31 Hz, CPh 4-H), 6.84 (d, 2H,  $J$  = 8.75 Hz, NPh 3,5-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 160.7 (C = N), 160.6 (CPh C-1), 157.4 (NPh C-1), 139.7 (NPh C-4), 133.0 (CPh C-5), 132.7 (CPh C-6), 123.1 (NPh C-2,6), 119.9 (CPh C-2), 119.4 (CPh C-3), 116.9 (CPh C-4), 116.4 (NPh C-3,5). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 214.0861 [M + H] $^+$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_2^+$ , 214.0863, found 214.0861.

*5-((4-Hydroxyphenyl)imino)methylbenzene-1,3-diol (1d):* washed with hot ethyl acetate; yield 60%; m.p. decomposed at 238 °C. IR: 3481.2 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 3273.2 ( $\nu/\text{O-H}$ ), 1624.0 ( $\nu/\text{C}=\text{N}$ ), 1213.8 ( $\nu/\text{C-O}$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.46 (s, 1H, NPh OH), 9.44 (s, 2H, CPh OH), 8.39 (s, 1H, CH = N), 7.16 (d, 2H,  $J$  = 8.71 Hz, NPh 2,6-H), 6.78 (d, 2H,  $J$  = 8.71 Hz, NPh 3,5-H), 6.76 (d, 2H,  $J$  = 2.20 Hz, CPh 2,6-H), 6.32 (t, 1H,  $J$  = 2.21 Hz, CPh 4-H).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 158.6 (C = N), 157.4 (CPh C-1), 156.1 (NPh C-1), 142.6 (NPh C-4), 138.3 (CPh C-3,5), 122.5 (NPh C-2,6), 115.7 (NPh C-3,5), 106.4 (CPh C-2,6), 105.2 (CPh C-4). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 230.0811 [M + H] $^+$  calc. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{NO}_3^+$ , 230.0812, found 230.0811.

4-[(4-Hydroxyphenyl)imino]methyl]anisole (**1e**): recrystallized from ethanol; yield 40%; m.p. 188–190 °C. IR: 1602.8 ( $\nu$ /C = N), 1221.3 ( $\nu$ /C-O). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.42 (s, 1H, OH), 8.51 (s, 1H, CH = N), 7.83 (d, 2H, J = 8.75 Hz, CPh 2,6-H), 7.15 (d, 2H, J = 8.67 Hz, NPh 2,6-H), 7.04 (d, 2H, J = 8.70 Hz, CPh 3,5-H), 6.78 (d, 2H, J = 8.67 Hz, NPh 3,5-H), 3.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 161.5 (CPh C-1), 156.6 (C = N), 155.9 (NPh C-1), 143.0 (NPh C-4), 130.0 (CPh C-2,6), 129.4 (CPh C-4), 122.3 (NPh C-2,6), 115.7 (NPh C-3,5), 114.2 (CPh C-3,5), 55.4 (CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 228.1018 [M + H]<sup>+</sup> calc. for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>, 228.1019, found 228.1018.

4-[(4-Hydroxyphenyl)imino]methyl]bromobenzene (**1f**): recrystallized from acetonitrile; yield 33%; m.p. 205–206 °C. IR: 1618.7 ( $\nu$ /C = N), 1223.9 ( $\nu$ /C-O). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.54 (s, 1H, OH), 8.61 (s, 1H, CH = N), 7.84 (d, 2H, J = 8.48 Hz, CPh 2,6-H), 7.70 (d, 2H, J = 8.40 Hz, CPh 3,5-H), 7.22 (d, 2H, J = 8.70 Hz, NPh 2,6-H), 6.80 (d, 2H, J = 8.70 Hz, NPh 3,5-H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 156.5 (CPh C-1), 155.9 (C = N), 142.2 (NPh C-1), 135.7 (NPh C-4), 131.8 (CPh C-3,5), 130.0 (CPh C-2,6), 124.3 (CPh C-4), 122.7 (NPh C-2,6), 115.7 (NPh C-3,5). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 276.0018 [M + H]<sup>+</sup> calc. for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NOBr, 276.0019, found 276.0018.

2-[(4-Hydroxyphenyl)imino]methyl]bromobenzene (**1g**): recrystallized from acetonitrile; yield 35%; m.p. 152–153 °C. IR: 1613.7 ( $\nu$ /C = N), 1236.2 ( $\nu$ /C-O). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.62 (s, 1H, OH), 8.79 (s, 1H, CH = N), 8.11 (dd, 1H, J = 7.75 Hz, CPh 6-H), 7.74 (dd, 1H, J = 7.94 Hz, CPh 63H), 7.50 (t, 1H, J = 7.43 Hz, CPh 5-H), 7.44 (td, 1H, J = 7.61 Hz, CPh 4-H), 7.23 (d, 2H, J = 8.73 Hz, NPh 2,6-H), 6.83 (d, 2H, J = 8.73 Hz, NPh 3,5-H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 156.9 (CPh C-1), 155.0 (C = N), 142.2 (NPh C-1), 134.3 (CPh C-2), 133.2 (CPh C-3), 132.6 (CPh C-4), 128.5 (CPh C-6), 128.1 (CPh C-5), 125.0 (NPh C-4), 122.7 (NPh C-2,6), 115.9 (NPh C-3,5). HRMS (ESI+)  $m/z$ : 276.0018 [M + H]<sup>+</sup> calc. for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NOBr, 276.0019, found 276.0018.

#### 4.2. Cell Culture and Treatments

The mouse neuro-2a (N2a) neuroblastoma cell line (Ref: CCL-131, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Lonza, Amboise, France) containing 10% (*v/v*) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) (30 min, 56 °C) and 1% (*v/v*) of penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL) (Pan Biotech). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) and passaged twice a week. The cells were seeded at 60,000 cells per well containing 1 mL of DMEM supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated FBS and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin) in 24-well plates (FALCON, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The stock solutions of resveratrol (trans-resveratrol, **RSV**) and aza-stilbenes (**AZA-ST 1a** to **1g**) were prepared as follows: resveratrol (reference of the product: 501-36-0; purity 99%; Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) was prepared at 50 mM in absolute ethanol (EtOH; Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France); **AZA-ST 1a** to **1g** were prepared at 50 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich). The aspects of resveratrol and aza-stilbenes in solution are shown in supplementary Figure S3. In order to evaluate the effects of aza-stilbenes on N2a cells comparatively to resveratrol (effects on cell density, esterase activity and transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi$ m)), the growth medium was removed after 24 h of culture and the N2a cells were incubated either with resveratrol or aza-stilbenes used at various concentrations ranging from 1.5 to 100  $\mu$ M for 48 h. The highest concentration of 100  $\mu$ M is obtained by diluting 16  $\mu$ L of stock solution (resveratrol or aza-stilbene; stock solution at 50 mM) in 8 mL of culture medium. Concentrations of 50 to 1.5  $\mu$ M are obtained by successive dilution in cascade of two by two in culture medium. The effects of vehicles (DMSO, ethanol) were evaluated at their highest concentration (0.2% *v/v*).

#### 4.3. Measurement of Cell Density: Sulforhodamine 101 (SR101) Assay

Sulforhodamine 101 (SR101) (reference of the product: S7635, Sigma Aldrich) assay was used to assess the cytotoxic effect of resveratrol and AZA-ST on N2a cells at different concentrations ranging from 1.5 to 100  $\mu$ M. SR101 is an anionic dye that electrostatically

binds to cellular proteins [35,36]. SR101 permits the quantification of adherent cells, considered as viable cells, since cell death is associated with a loss of cell adhesion. The experiments were realized four times in triplicate. The data were expressed as percentage of the control.

#### 4.4. Measurement of Esterase Activity: Fluorescein Diacetate (FDA) Assay

Cell viability was measured with the fluorescein diacetate (FDA) (reference of the product: F1303, Invitrogen/Molecular Probes) assay, which considers esterase [35,41]. The N2a cells, previously cultured for 24 h in 24-well plates in DMEM containing 10% FBS, were further incubated for 48 h, with and without resveratrol, or AZA-ST, used at different concentrations (1.5 to 100  $\mu$ M). At the end of treatment, cells were incubated in the dark with 15  $\mu$ g/mL FDA for 5 min at 37 °C, rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS), then lysed with 10 mM Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 10 min. Using a TECAN fluorescence microplate reader (Sunrise spectrophotometer, TECAN, Lyon, France), the fluorescence intensity was measured with an excitation at 485 nm and an emission at 528 nm. All assays were performed in three independent experiments and performed in triplicate. Data were expressed as percentage of untreated cells (control).

#### 4.5. Measurement of Transmembrane Mitochondrial Potential ( $\Delta\Psi$ m): 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine IODIDE (DiOC<sub>6</sub>(3)) Assay

The variation of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ m) was measured using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)) (D273, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France). This fluorochrome accumulates in the mitochondria proportionally to the  $\Delta\Psi$ m value [42]. The higher the  $\Delta\Psi$ m, the more the probe accumulates. After 48 h of treatment, adherent cells collected by trypsinization were pooled with non-adherent cells and stained with a solution of DiOC<sub>6</sub>(3) at 40 nM (15 min; 37 °C). The cells were immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The loss of  $\Delta\Psi$ m is indicated by a decrease in the intensity of the green fluorescence collected through a band pass filter of 520  $\pm$  10 nm. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analyzed with FlowJo (Tree Star Inc., Carboro, NC, USA) software. All assays were performed in triplicate.

#### 4.6. Measurement of Antioxidant Activity with the KRL (Kit Radicaux Libres) Assay

The KRL (Kit Radicaux Libres) test was used to assess the oils' overall antioxidant activity by their ability to protect erythrocytes against a controlled free radical attack at varying concentrations [20,21]. Diluted control blood samples were exposed to organic free radicals generated at 37 °C from the thermal decomposition of a solution of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). In order to record haemolysis, the turbidimetric optical density decline at 620 nm was measured using a 96-well microplate reader (KRL Reader, Kirial International; Couternon, France). The antioxidant activity of the tested oil samples was expressed in Trolox equivalents and gallic acid equivalent. Lara-Spiral laboratory performed the KRL test (Couternon, France).

#### 4.7. Measurement of Antioxidant Activity with the DPPH (2,2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical) Assay

The DPPH• radical is a stable soluble molecule characterized by its deep-violet color, with an absorption maximum at 515 nm. Antioxidants (AH) or other radical species (R•) are able to react with this stable radical (DPPH•) by providing an electron or hydrogen atom, thus reducing it to 2,2-diphenyl-1-hydrazine (DPPH-H) or a substituted analogous hydrazine (DPPH-R) characterized by colorless or pale-yellow color that could be easily monitored with a spectrophotometer. In the present study, the free radical scavenging activity was determined by the DPPH assay as previously described [22]. DPPH• was prepared in 95% methanol and protected from light. In 96-well plates, 40  $\mu$ L of DPPH (0.2 mmol/L)

was added to 160  $\mu\text{L}$  of sample or blank, and the mixture was homogenized and left to stand in the dark for 30 min. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 517 nm, and DPPH $\bullet$  radical scavenging activity was expressed as a percent of inhibition (PI) using the following equation:

$$\text{PI} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

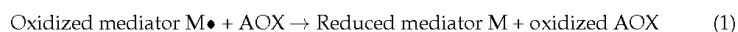
where  $A_0$  is the absorbance of the DPPH solution, and  $A_1$  is the absorbance of the DPPH solution after the addition of the sample. All assays were performed in three independent experiments and performed in triplicate.

#### 4.8. Measurement of Antioxidant Activity with the Ferric Reducing Antioxidant (FRAP) Assay

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) is based on the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  (ferric ions) to  $\text{Fe}^{2+}$  (ferrous ions), and the assay was carried using previously described methods [23,24]. At low pH, in the presence of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, Sigma Aldrich, France), the ferric-tripyridyltriazine complex ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) is reduced to ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) with the formation of an intense blue color with an absorption maximum at 593 nm. Briefly, 2.3 mL of FRAP reagent (contains 100 mL of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6; 20 mL of 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl; and 20 mL of 20 mM  $\text{FeCl}_3$ ) was mixed with 0.7 mL of the product (resveratrol or aza-stilbene **1a–1g**) at different concentrations. The mixture was then incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 30 min in the dark. The absorbance was measured at 593 nm against a blank containing all the reagents, except the sample, using a spectrophotometer (Safas Xenus, Monaco). The increase in absorbance of the reaction mixture indicates an increase in reduction capacity. Results of the samples were expressed as  $\mu\text{Mol Fe}^{2+}$  reduced per mM of resveratrol and aza-stilbenes from a standard calibration curve of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

#### 4.9. Measurement of Antioxidant Activity with the PAOT Liquid<sup>®</sup> Technology Assay

The total antioxidant power of resveratrol and aza-stilbenes was also determined by PAOT Liquid<sup>®</sup> Technology (patent FR1871986; 11.28.2018; <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/066776410/publication/US2022031230A1?q=FR1871986>; accessed on 19 July 2022). This method was based on an electrochemical reaction with a molecule in a free radical state (mediator  $\text{M}\bullet$ ), following Equation 1 (Equation (1)) [25].



Analysis was started with electrochemical potential measurement (EP control  $t_0$ ) of the reaction medium (1 mL), and then 20  $\mu\text{L}$  of sample was added. The potential product (EP product  $t_4$ ) was registered after 4 min of interaction between the sample that contains antioxidants and reduced mediator  $\text{M}\bullet$ .

The variation ratio of the oxidized and reduced forms of the mediator  $\text{M}\bullet$  during reaction gives an estimation of antioxidant activity in the sample by using Equation 2 (Equation (2))

$$\text{Antioxidant activity} = X 100\% \quad (2)$$

The results were expressed as PAOT score per liter (PAOT Score/L) of the analyzed sample.

#### 4.10. Statistical Analysis

The experimental results were statistically analyzed with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) and compared with a Student's  $t$ -test. A  $p$ -value less than 0.05 was considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27154713/s1>, <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C (126 MHz) NMR and HMBC-NMR spectra of the seven aza-stilbenes synthesized; aspects of resveratrol and aza-stilbenes in solution.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.V., G.L. and D.V.-F.; methodology, A.V., G.L. and D.V.-F.; Investigation/Experimental work: M.K., T.N., I.G., S.M., E.P.-C., P.D., D.V.-F. and D.D.; Discussion: N.L., M.P., G.L., A.V., and D.V.-F.; writing—original draft preparation, A.V., G.L. and D.V.-F.; funding acquisition, A.V., G.L., T.G., O.M.-K. and D.V.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Université de Bourgogne (G.L., A.V., D.V.-F.), Région Bourgogne Franche-Comté (Projet MEDICTA, Appel à Projet Région 2020, G.L., A.V., D.V.-F.), Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne ICMUB UMR CNRS 6302 (D.V.-F.). M.K. received financial support from PHC Utique (G.L./T.G. and O.M.-K.; 2021–2022; code CMCU22G089/code Campus France 47608V).

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

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are available at the Institute of Molecular Chemistry of University of Burgundy (ICMUB UMR CNRS 6302; Dijon, France) and at Laboratory Bio-peroxIL (University of Burgundy/Inserm, Dijon, France).

**Acknowledgments:** Imen Ghzaïel (I.G.) received financial support from Nutrition Méditerranéenne et Santé Association (NMS; Norbert Latruffe.), and Institut Européen des Antioxydants (IEA, Smail Meziane). I.G. and Mohamed Ksila (M.K.) received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine; Dijon, France). G.L. is member of the International Natural Product Sciences Taskforce (INPST: <https://inpst.net/> accessed on 20 April 2022). G.L. and N.L. are members of the international network of the UNESCO Chair 'Culture and tradition of wine' (<http://chaireunesco-vinetculture.u-bourgogne.fr/> accessed on 20 May 2022).

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

**Sample Availability:** Samples of the compounds **1a–1g** are available from the authors.

## References

1. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységou, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew. Chem.* **2011**, *50*, 596–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lucarini, M.; Durazzo, A.; Lombardi-Boccia, G.; Souto, E.B.; Cecchini, F.; Santini, A. Wine polyphenols and health: Quantitative research literature analysis. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 4762. [[CrossRef](#)]
3. Gao, Y.; Yu, X.; Wang, B.; Yin, G.; Wang, J.; Wang, T.; Bi, K. Based on multi-activity integrated strategy to screening, characterization and quantification of bioactive compounds from red wine. *Molecules* **2021**, *26*, 6750. [[CrossRef](#)]
4. Colica, C.; Milanovic, M.; Milié, N.; Aiello, V.; De Lorenzo, A.; Abenavoli, L. A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 1195–1203. [[CrossRef](#)]
5. Yamine, A.; Namsi, A.; Vervandier-Fasseur, D.; Mackrill, J.J.; Lizard, G.; Latruffe, N. Polyphenols of the mediterranean diet and their metabolites in the prevention of colorectal cancer. *Molecules* **2021**, *26*, 3483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pezzuto, J.M. Resveratrol: Twenty years of growth, development and controversy. *Biomol. Ther.* **2019**, *27*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Walle, T. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 9–15. [[CrossRef](#)]
8. Cardile, V.; Chillemi, R.; Lombardo, L.; Sciuto, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. Antiproliferative activity of methylated analogues of *E*- and *Z*-resveratrol. *Z. Naturforsch. C* **2007**, *62*, 189–195. [[CrossRef](#)]
9. Liu, Q.; Kim, C.T.; Jo, Y.H.; Kim, S.B.; Hwang, B.Y.; Lee, M.K. Synthesis and biological evaluation of resveratrol derivatives as melanogenesis inhibitors. *Molecules* **2015**, *20*, 16933–16945. [[CrossRef](#)]
10. Nawaz, W.; Zhou, Z.; Deng, S.; Ma, X.; Ma, X.; Li, C.; Shu, X. Therapeutic versatility of resveratrol derivatives. *Nutrients* **2017**, *9*, 1188. [[CrossRef](#)]
11. Chalal, M.; Vervandier-Fasseur, D.; Meunier, P.; Cattet, H.; Hierso, J.C. Syntheses of polyfunctionalized resveratrol derivatives using Wittig and Heck protocols. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3899–3907. [[CrossRef](#)]
12. Chalal, M.; Klinguer, A.; Echairi, A.; Meunier, P.; Vervandier-Fasseur, D.; Adrian, M. Antimicrobial activity of resveratrol analogues. *Molecules* **2014**, *19*, 7679–7688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Chalal, M.; Delmas, D.; Meunier, P.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D. Inhibition of cancer derived cell lines proliferation by newly synthesized hydroxylated stilbenes and ferrocenyl-stilbene analogs. Comparison with resveratrol. *Molecules* **2014**, *19*, 7850–7868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D. Strategic syntheses of vine and wine resveratrol derivatives to explore their effects on cell functions and dysfunctions. *Diseases* **2018**, *6*, 110. [[CrossRef](#)]
15. Belluti, F.; Fontana, G.; Dal Bo, L.; Carenini, N.; Giommarelli, C.; Zunino, F. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3543–3550. [[CrossRef](#)]
16. Bellina, F.; Guazzelli, N.; Lessi, M.; Manzini, C. Imidazole analogues of resveratrol: Synthesis and cancer cell growth evaluation. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2298–2305. [[CrossRef](#)]
17. Li, C.; Xu, X.; Wang, X.J.; Pan, Y. Imine resveratrol analogues: Molecular design, Nrf2 activation and SAR analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101455.
18. Bae, S.J.; Ha, Y.M.; Kim, J.A.; Park, J.Y.; Ha, T.K.; Park, D.; Chun, P.; Park, N.H.; Moon, H.R.; Chung, H.Y. A novel synthesized tyrosinase inhibitor: (E)-2-((2,4-dihydroxyphenyl)diazinyl)phenyl-4-methylbenzenesulfonate as an azo-resveratrol analog. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 65–72. [[CrossRef](#)]
19. Lizard, G.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D. Aza- and Azo-stilbenes: Bio-isosteric analogs of resveratrol. *Molecules* **2020**, *25*, 605. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, Y.; Zou, B.; Pan, Y.; Liang, H.; Yi, X.; Wang, H. Antioxidant activities and transition metal ion chelating studies of some hydroxyl Schiff base derivatives. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
21. Siddiqui, A.; Dandawate, P.; Rub, R.; Padhye, S.; Aphale, S.; Moghe, A.; Jagyasi, A.; Swamy, K.V.; Singh, B.; Chatterjee, A.; et al. Novel aza-resveratrol analogs: Synthesis, characterization and anti-cancer activity against breast cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 635–640. [[CrossRef](#)]
22. Ronghe, A.; Chatterjee, A.; Singh, B.; Dandawate, P.; Murphy, L.; Bhat, N.K.; Padhye, S.; Bhat, H.K. Differential regulation of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by 4-(E)-[(4-hydroxyphenylimino)-methylbenzene-1,2-diol], a novel resveratrol analog. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *144*, 500–512. [[PubMed](#)]
23. Tanaka, K.; Shiraishi, R. Clean and efficient condensation reactions of aldehydes and amines in a water suspension medium. *Green Chem.* **2000**, *2*, 272–273. [[CrossRef](#)]
24. Lu, J.; Li, C.; Chai, Y.F.; Yang, D.Y.; Sun, C.R. The anti-oxidant effect of imine resveratrol analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5744–5747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kotora, P.; Sersen, F.; Filo, J.; Loos, D.; Gregan, J.; Gregan, F. The scavenging of DPPH, galvinoxyl and ABTS radicals by imine analogs of resveratrol. *Molecules* **2016**, *21*, 127. [[CrossRef](#)]
26. Yammine, A.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Mackrill, J.J.; Greige-Gerges, H.; Auezova, L.; et al. Prevention by Dietary Polyphenols (Resveratrol, Quercetin, Apigenin) Against 7-Ketocholesterol-Induced Oxidative Phagocytosis in Neuronal N2a Cells: Potential Interest for the Treatment of Neurodegenerative and Age-Related Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 2346. [[CrossRef](#)]
27. Zarrouk, A.; Martine, L.; Grégoire, S.; Nury, T.; Meddeb, W.; Camus, E.; Badreddine, A.; Durand, P.; Namsi, A.; Yammine, A.; et al. Profile of Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols and Polyphenols in Mediterranean Oils (Argan Oils, Olive Oils, Milk Thistle Seed Oils and Nigella Seed Oil) and Evaluation of their Antioxidant and Cytoprotective Activities. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 1791–1805. [[CrossRef](#)]
28. Alashi, A.M.; Taiwo, K.A.; Oyedele, D.J.; Adebooye, O.C.; Aluko, R.E. Polyphenol composition and antioxidant properties of vegetable leaf-fortified bread. *J. Food Biochem.* **2019**, *43*, e12625. [[CrossRef](#)]
29. Dudonne, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774. [[CrossRef](#)]
30. Benzie, I.F.; Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 15–27.
31. Pincemail, J.; Kaci, M.-M.; Kevers, C.; Tabart, J.; Elle, R.E.; Meziane, S. PAOT-Liquid<sup>®</sup> Technology: An Easy Electrochemical Method for Evaluating Antioxidant Capacity of Wines. *Diseases* **2019**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Caruso, F.; Tanski, J.; Villegas-Estrada, A.; Rossi, M. Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7279–7285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rossi, M.; Caruso, F.; Opazo, C.; Salciccioli, J. Crystal and molecular structure of piceatannol: Scavenging features of resveratrol and piceatannol on hydroxyl and peroxy radicals docking with transthyretin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *62*, 10557–10566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gaenko, A.V.; Devarajan, A.; Gagliardi, L.; Lindh, R.; Orlandi, G. Ab initio DFT study of Z-E isomerization pathways of N-benzylideneaniline. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 271–279. [[CrossRef](#)]
35. Namsi, A.; Nury, T.; Hamdouni, H.; Yammine, A.; Vejux, A.; Vervandier-Fasseur, D.; Latruffe, N.; Masmoudi-Kouki, O.; Lizard, G. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Diseases* **2018**, *6*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



36. Yammine, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Greige-Gerges, H.; Auezova, L.; Lizard, G. Prevention of 7-Ketocholesterol-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death with Major Nutrients (Polyphenols,  $\omega$ 3 and  $\omega$ 9 Unsaturated Fatty Acids) of the Mediterranean Diet on N2a Neuronal Cells. *Molecules* **2020**, *25*, 2296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lakey-Beitia, J.; Burillo, A.M.; La Penna, G.; Hegde, M.L.; Rao, K.S. Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2021**, *82*, S335–S357. [[CrossRef](#)]
38. Uddin, M.S.; Mamun, A.A.; Rahman, M.M.; Jeandet, P.; Alexiou, A.; Behl, T.; Sarwar, M.S.; Sobarzo-Sánchez, E.; Ashraf, G.M.; Sayed, A.; et al. Natural Products for Neurodegeneration: Regulating Neurotrophic Signals. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, *2021*, 8820406. [[CrossRef](#)]
39. Kaminski, J.; Lançon, A.; Aires, V.; Limagne, E.; Tili, E.; Michaille, J.J.; Latruffe, N. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1251–1259. [[CrossRef](#)]
40. Cho, M.R.; Lee, S.; Song, S.K. A Review of Sarcopenia Pathophysiology, Diagnosis, Treatment and Future Direction. *J. Korean Med. Sci.* **2022**, *37*, e146. [[CrossRef](#)]
41. Namsi, A.; Nury, T.; Khan, A.S.; Leprince, J.; Vaudry, D.; Caccia, C.; Leoni, V.; Atanasov, A.G.; Tonon, M.C.; Masmoudi-Kouki, O.; et al. Octadecaneuropeptide (ODN) Induces N2a Cells Differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-Dependent Pathway: Incidence on Peroxisome, Mitochondria, and Lipid Profiles. *Molecules* **2019**, *24*, 3310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ragot, K.; Mackrill, J.J.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Aires, V.; Jacquin, A.; Athias, A.; Pais de Barros, J.P.; Vejux, A.; Riedinger, J.M.; et al. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

# Characterization of Cell Death Induced by Imine Analogs of Trans-Resveratrol: Induction of Mitochondrial Dysfunction and Overproduction of Reactive Oxygen Species Leading to, or Not, Apoptosis without the Increase in the S-Phase of the Cell Cycle

Mohamed Ksila <sup>1,2</sup>, Imen Ghzaïel <sup>1</sup>, Vivien Pires <sup>1</sup>, Taoufik Ghraïri <sup>2</sup>, Olfa Masmoudi-Kouki <sup>2</sup>, Norbert Latruffe <sup>1</sup>, Dominique Vervandier-Fasseur <sup>3</sup>, Anne Vejux <sup>1</sup> and Gérard Lizard <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA7270/Inserm, University of Bourgogne, 21000 Dijon, France; mohamedksila44@gmail.com (M.K.); imenghzaïel93@gmail.com (I.G.); vivien.pires@u-bourgogne.fr (V.P.); norbert.latruffe@u-bourgogne.fr (N.L.); anne.vejux@u-bourgogne.fr (A.V.)  
<sup>2</sup> Laboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology and Valorisation of Biomolecules, (LR18ES03), Department of Biology, Faculty of Sciences, University Tunis El Manar, Tunis 2092, Tunisia; taoufik.ghraïri@fst.utm.tn (T.G.); olfa.masmoudi@fst.utm.tn (O.M.-K.)  
<sup>3</sup> Team OCS, Institute of Molecular Chemistry (ICMUB UMR CNRS 6302), University of Bourgogne, 21000 Dijon, France; dominique.vervandier-fasseur@u-bourgogne.fr  
 \* Correspondence: gerard.lizard@u-bourgogne.fr



**Citation:** Ksila, M.; Ghzaïel, I.; Pires, V.; Ghraïri, T.; Masmoudi-Kouki, O.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Vejux, A.; Lizard, G. Characterization of Cell Death Induced by Imine Analogs of Trans-Resveratrol: Induction of Mitochondrial Dysfunction and Overproduction of Reactive Oxygen Species Leading to, or Not, Apoptosis without the Increase in the S-Phase of the Cell Cycle. *Molecules* **2023**, *28*, 3178. <https://doi.org/10.3390/molecules28073178>

Academic Editor: René Csuk

Received: 14 March 2023

Revised: 30 March 2023

Accepted: 31 March 2023

Published: 3 April 2023



**Copyright:** © 2023 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/>).

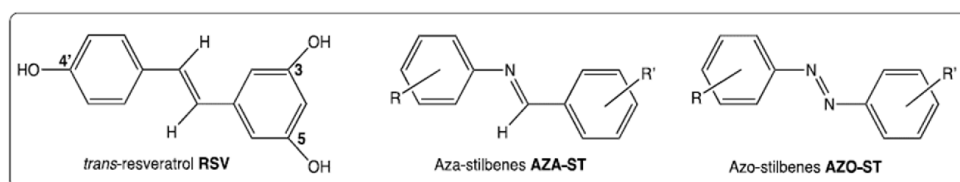
**Abstract:** *Trans-resveratrol* (RSV) is a non-flavonoid polyphenol (stilbene) with numerous biological activities, such as anti-tumor activities. However, RSV is rapidly metabolized, which limits its therapeutic use. The availability of RSV analogues with similar activities for use in vivo is therefore a major challenge. For this purpose, several isomeric analogues of RSV, aza-stilbenes (AZA-ST 1a–g), were synthesized, and their toxicities were characterized and compared to those of RSV on murine N2a neuronal cells using especially flow cytometric methods. All AZA-ST 1a–g have an inhibitory concentration 50 (IC50) between 11.3 and 25  $\mu$ M when determined by the crystal violet assay, while that of RSV is 14.5  $\mu$ M. This led to the characterization of AZA-ST 1a–g—induced cell death, compared to RSV, using three concentrations encompassing the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). For AZA-ST 1a–g and RSV, an increase in plasma membrane permeability to propidium iodide was observed, and the proportion of cells with depolarized mitochondria measured with DiOC<sub>6</sub>(3) was increased. An overproduction of reactive oxygen species (ROS) was also observed on whole cells and at the mitochondrial level using dihydroethidium and MitoSox Red, respectively. However, only RSV induced a mode of cell death by apoptosis associated with a marked increase in the proportion of cells with condensed and/or fragmented nuclei (12.5  $\mu$ M: 22  $\pm$  9%; 25  $\mu$ M: 80  $\pm$  10%) identified after staining with Hoechst 33342 and which are characteristic of apoptotic cells. With AZA-ST, a slight but significant increase in the percentage of apoptotic cells was only detected with AZA-ST 1b (25  $\mu$ M: 17  $\pm$  1%) and AZA-ST 1d (25  $\mu$ M: 26  $\pm$  4%). Furthermore, only RSV induced significant cell cycle modifications associated with an increase in the percentage of cells in the S phase. Thus, AZA-ST 1a–g—induced cell death is characterized by an alteration of the plasma membrane, an induction of mitochondrial depolarization (loss of  $\Delta\Psi_m$ ), and an overproduction of ROS, which may or may not result in a weak induction of apoptosis without modification of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle.

**Keywords:** apoptosis; aza-stilbenes; cell death; cell cycle; flow cytometry; imine analogs of *trans-resveratrol*; mitochondria; oxidative stress; *trans-resveratrol*

## 1. Introduction

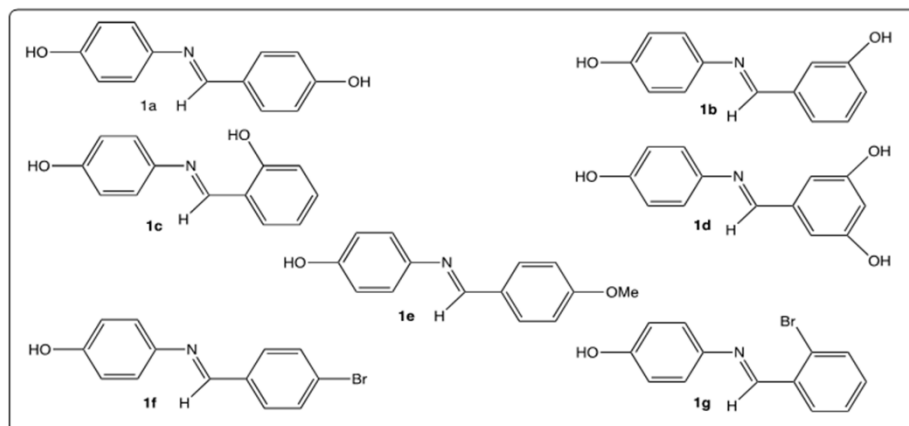
Polyphenols are molecules present in many plants and are major components of the Mediterranean diet, known for its health benefits [1,2]. These molecules are subdivided

into two groups: flavonoids and non-flavonoids [3]. Among the latter, *trans*-resveratrol (RSV), which belongs to the stilbene subclass, is one of the most studied polyphenols because of its numerous biological activities, including antioxidant [4], anti-inflammatory [5], anti-tumor [6], and anti-ageing activities [7]. RSV has also shown neurotrophic activities in the context of Parkinson's disease [8] and cytoprotective activities against oxidized cholesterol derivatives (oxysterols, especially 7-ketocholesterol, mainly formed by cholesterol autoxidation [9]), often found in increased amounts in patients with age-related diseases (cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, and age-related macular degeneration) [10]. However, one of the major problems observed with RSV is its rapid catabolism by the intestinal microbiota and at the blood and tissue levels, leading to the formation of inactive metabolites that limit its therapeutic use [11]. If increasing the bioavailability of RSV by using galenic solutions (micro- and nano-encapsulation, functionalized nanoparticles) fails, it is also possible to synthesize analogues of RSV, which requires ensuring that the latter retain biological activities close to those of RSV or even are more effective. Currently, several synthetic derivatives of RSV have been developed that retain the original stilbene structure and preserve its water-soluble character. Moreover, the C=C bond may be replaced with an isosteric fragment as an aromatic heterocycle [12] or with a C=N bond or an N=N bond to provide aza-stilbenes (AZA-ST) [13] and azo-stilbenes [14], respectively [15] (Figure 1).



**Figure 1.** Structure of *trans*-resveratrol (RSV), aza-stilbenes (AZA-ST), and azo-stilbenes (AZO-ST) [15].

We previously reported the synthesis of a series of seven imine analogs of RSV (AZA-ST 1a–g) (Figure 2) by an easy and low-cost green chemistry procedure [15]. In this study, the different AZA-STs were chemically characterized [15]. We showed that all AZA-ST 1a–g synthesized could be distinguished from RSV based on their cytotoxic and antioxidant characteristics. In this previous study, the cytotoxicity was evaluated with the sulforhodamine 101 (SR101), the fluorescein diacetate (FDA), and the DiOC<sub>6</sub>(3) assays, but the type of cell death was not characterized. However, the antioxidant activity of AZA-ST 1a–g was quantified with the KRL kit (Radicaux Libres) assay, the DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay, the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay, and the PAOT (Pouvoir AntiOxidant Total) score [15]. Based on their cytotoxic and antioxidant characteristics, the AZA-ST 1a–g was distinguishable from the RSV. Interestingly, the presence of one or more hydroxyl groups and their position on the aromatic cycle provide more or less strong antioxidant activities to AZA-STs compared to RSV [16]. At the moment, aza- and azo-stilbenes have been reported to oppose the aggregation of  $\beta$ -amyloids considered neurotoxic factors in Alzheimer's disease [17], and to inhibit cholinesterase [18]. Inhibition of growth through autophagy has been shown by aza- and azo-stilbenes against MDA-MB-231 and T47D breast cancer cell lines [19].



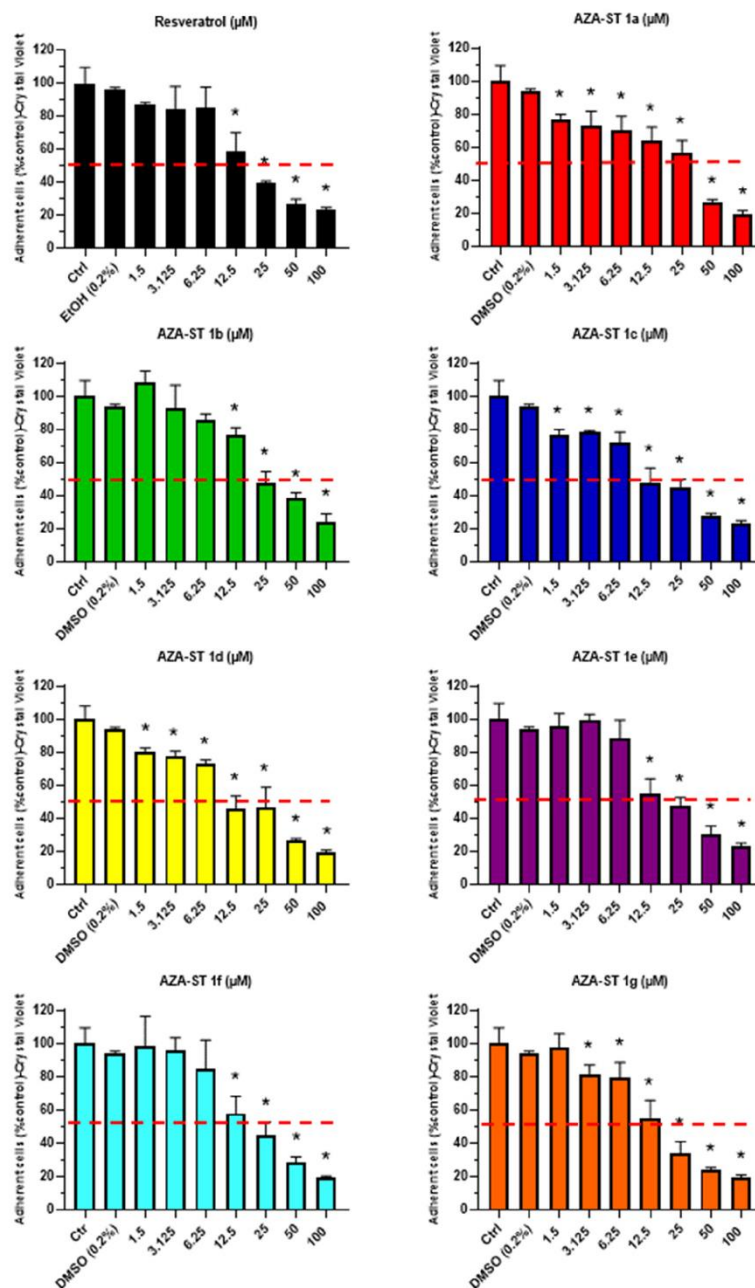
**Figure 2.** Structures of AZA-ST 1a–g [15].

The aim of the present study was to (i) compare the toxicity of AZA-ST 1a–g to RSV on murine N2a neuronal cells and (ii) characterize the mode of cell death induced by AZA-ST 1a–g and RSV on N2a cells. The inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined with the crystal violet assay [20]. The cell death was characterized by different criteria evaluated by flow cytometry: plasma membrane permeability evaluated with propidium iodide (PI), transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) measured with DiOC<sub>6</sub>(3), ROS overproduction measured on whole cells after staining with dihydroethidium (DHE) and at the mitochondrial level with MitoSox Red [21], and distribution of the cells in the different phases of the cell cycle [22]. In addition, nuclear morphology was determined after nuclear staining with Hoechst 33442, which allows to distinguish between viable, apoptotic, and necrotic/oncotic cells [23]. The different parameters studied permit to distinguish AZA-ST 1a–g—induced cell death from RSV-induced cell death.

## 2. Results

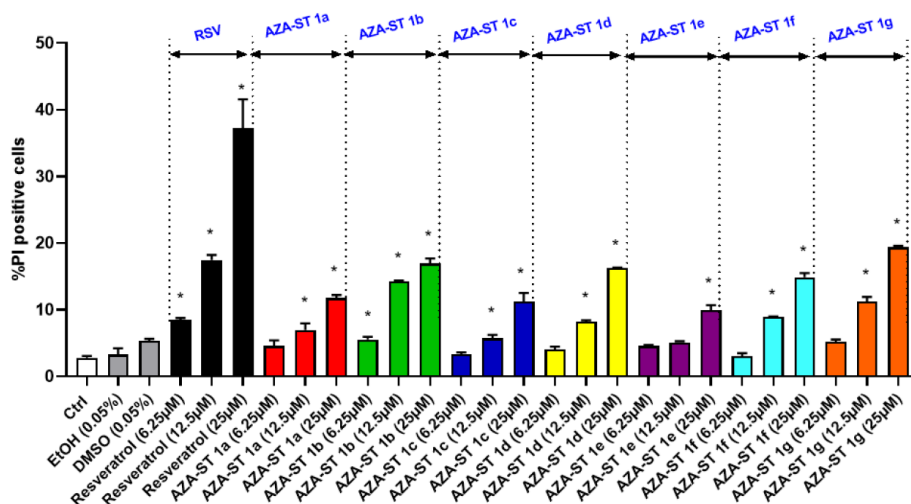
### 2.1. Cell Growth Evaluation by Crystal Violet Assay and Cell Viability Evaluation by Propidium Iodide Staining

The impact of AZA-ST 1a–g and *trans*-resveratrol (RSV) on cell growth was evaluated at the different concentrations (i.e., 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100  $\mu$ M) using the crystal violet assay, which permits the quantification of adherent cells. The calculated IC<sub>50</sub> values obtained with the crystal violet assay were in the same range of order and were the following: AZA-ST 1c:  $11.30 \pm 0.57$ ; AZA-ST 1d:  $11.48 \pm 0.57$ ; AZA-ST 1g:  $11.75 \pm 0.58$ ; AZA-ST 1e:  $12.43 \pm 0.62$ ; AZA-ST 1f:  $13.95 \pm 0.69$ ; RSV:  $14.95 \pm 0.74$ ; AZA-ST 1b:  $19.49 \pm 0.97$ ; AZA-ST 1a:  $25.00 \pm 1.25$  (Figure 3). This inhibition of cell growth, at concentrations including the IC<sub>50</sub>s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M), is associated with an increase in permeability to propidium iodide (PI), which is considered a criteria for cell death [24], and which also indicates that AZA-ST 1a–g—and RSV-induced cell death is associated with an alteration of the plasma membrane [23]. Thus, a more or less pronounced concentration-dependent increase in PI-positive cells (cells with damaged plasma membranes considered to be dead cells) was observed both with AZA-ST 1a–g and RSV (Figure 4).



**Figure 3.** Crystal violet assay evaluation of the effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on cell growth. N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (*trans*-resveratrol) in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$ . The dotted red line makes it possible to evaluate the value

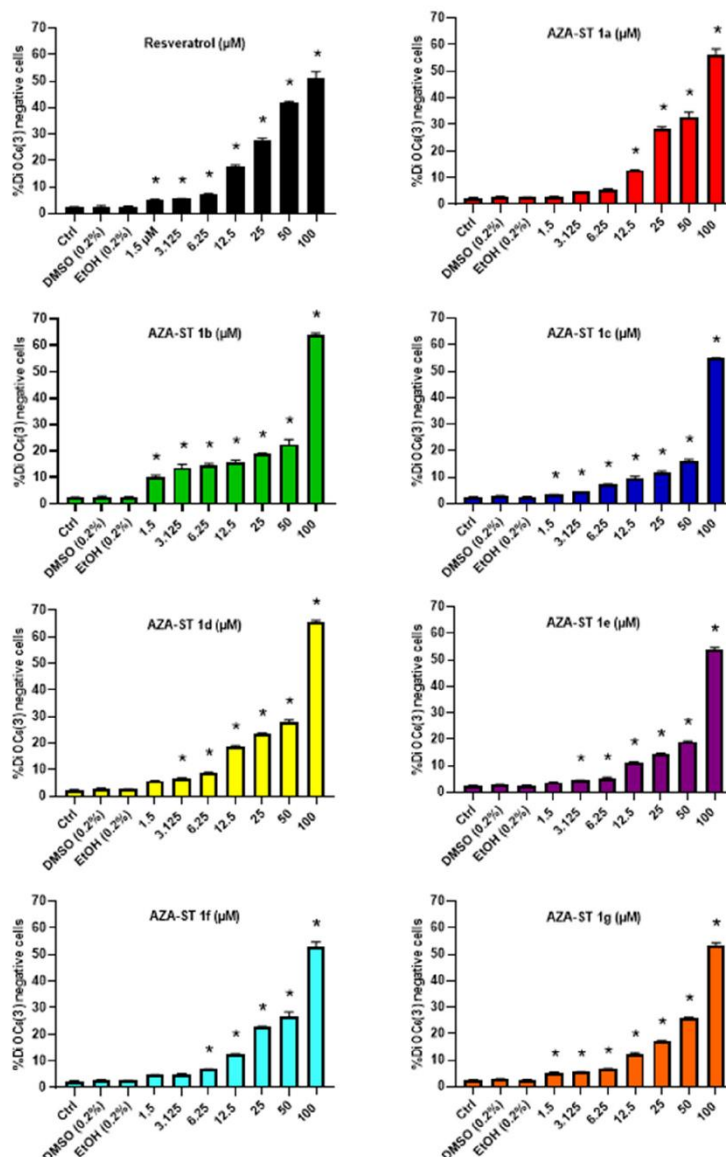
of the concentration (or the range of concentrations) reducing cell growth by 50% (IC50); IC50 values were calculated with GraphPad. Vehicle of AZA-ST: DMSO (0.2%) [15]. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.



**Figure 4.** Flow cytometric evaluation of the effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on plasma membrane damages and cell viability by staining with propidium iodide (PI). N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (*trans*-resveratrol) at concentrations in the range of the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]; EtOH (0.05%) and DMSO (0.05%); the highest concentrations of vehicles were only analyzed.

## 2.2. Measurement of Transmembrane Mitochondrial Potential by Staining with DiOC<sub>6</sub>(3)

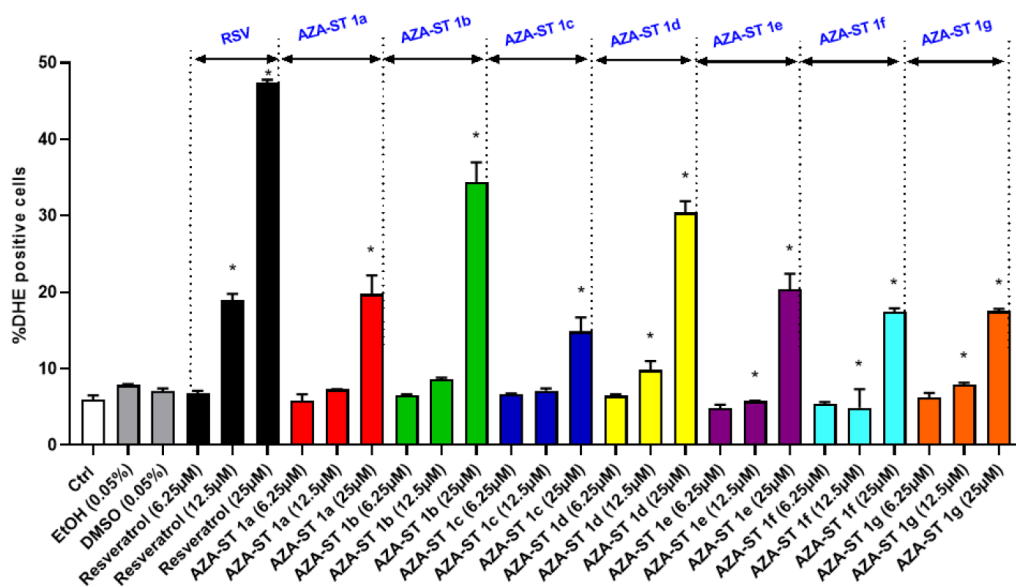
As it is well established that RSV-induced cell death is associated with a loss of transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) on different cell types, the ability of AZA-ST 1a–g and resveratrol (RSV) to trigger a loss of  $\Delta\Psi_m$  on N2a cells was measured by flow cytometry after staining with DiOC<sub>6</sub>(3). In these conditions, at concentrations including the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M), a more or less pronounced concentration-dependent increase of the percentage of cells with depolarized mitochondria (DiOC<sub>6</sub>(3) negative cells) was observed both with AZA-ST 1a–g and RSV (Figure 5).



**Figure 5.** Flow cytometric evaluation of the effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) by staining with DiOC<sub>6</sub>(3). N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations including the IC<sub>50</sub>s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]; EtOH (0.2%) and DMSO (0.2%); the highest concentrations of vehicles were only analyzed. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 2.3. Measuring Reactive Oxygen Species Production on Whole Cells at the Mitochondrial Level with Dihydroethidium and MitoSox Red

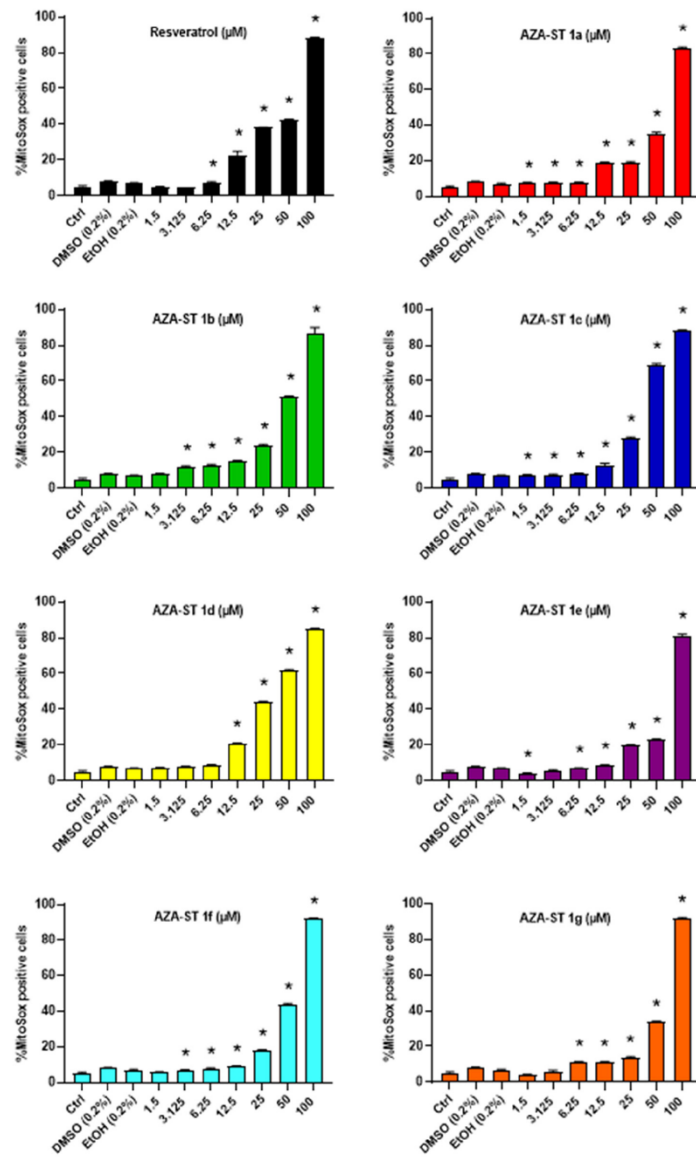
It is well known that oxidative stress can be associated with cell death and can contribute to cell damage induction in some molecules (lipids, proteins, and DNA) [25]. Therefore, the ability of AZA-ST 1a–g and RSV to trigger ROS overproduction on whole cells at the mitochondrial level was evaluated on N2a cells. At three concentrations in between the IC<sub>50</sub>s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M), an overproduction of ROS was observed on whole cells with AZA-ST 1a–g and RSV; the highest percentages of cells affected by ROS overproduction, which were identified by staining with dihydroethidium (DHE positive cells), were observed under treatment with RSV and were in the following order at 25  $\mu$ M: RSV > AZA-ST 1b > AZA-ST 1d > AZA-ST 1a–e > AZA-ST 1f–g > AZA-ST 1c (Figure 6).



**Figure 6.** Flow cytometric evaluation of the effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on ROS overproduction in whole cells by staining with dihydroethidium (DHE). N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations including the IC<sub>50</sub>s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]: Ethanol (EtOH; 0.05%) and DMSO (0.05%); the highest concentrations of vehicles were only analyzed. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

In addition, ROS overproduction was also measured at the mitochondrial level after staining with MitoSox Red in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu$ M. A more or less pronounced concentration-dependent increase in the percentage of cells with an overproduction of ROS occurring at the mitochondrial level (MitoSox positive cells) was observed both with AZA-ST 1a–g and RSV (Figure 7).

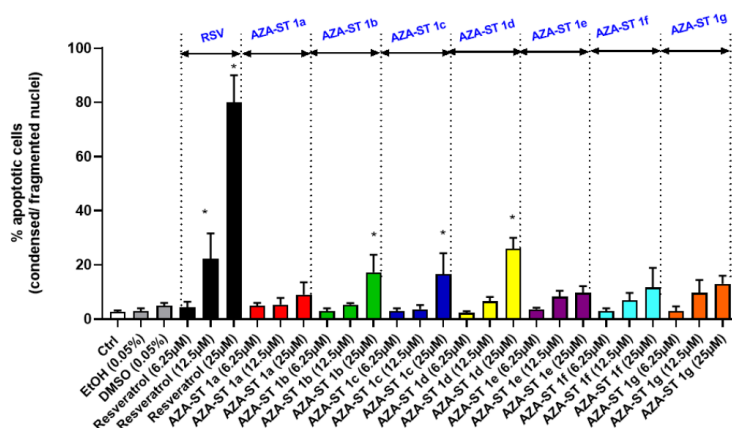




**Figure 7.** Flow cytometric evaluation of the effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on ROS overproduction at the mitochondrial level by staining with MitoSox Red. N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations from 1.5 to 100 μM. Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]: Ethanol (EtOH; 0.2%) and DMSO (0.2%); the highest concentrations of vehicles were the only ones analyzed. The data are the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

#### 2.4. Microscopical Characterization of Cell Death after Nuclei Staining with Hoechst 33342

RSV is known to induce apoptosis in different cell types. This polyphenol can also activate alternative pathways leading to cell death, such as those leading to autophagy, senescence, or mitotic catastrophe [26]. It was therefore important to determine whether AZA-ST 1a–g induces or not the same type of cell death as RSV on N2a cells. Cell death was morphologically characterized by fluorescence microscopy after nuclei were stained with Hoechst 33342 [23]. Indeed, this microscopical method is suitable to easily identify apoptotic cells, which are characterized by condensed and/or fragmented nuclei [23,27]. In these conditions, at the three concentrations corresponding to the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M), only RSV induced a marked mode of cell death by apoptosis associated with a strong increase in the proportion of cells with condensed and/or fragmented nuclei (12.5  $\mu$ M:  $22 \pm 9\%$ ; 25  $\mu$ M:  $80 \pm 10\%$ ) (Figure 8). With AZA-ST, a slight but significant increase in the percentage of apoptotic cells was only detected with AZA-ST 1b (25  $\mu$ M:  $17 \pm 1\%$ ) and AZA-ST 1d (25  $\mu$ M:  $26 \pm 4\%$ ) (Figure 8). Slight and not significant increases in apoptotic cells were observed with AZA-ST 1a, 1c, 1e, 1f, and 1g (Figure 8).



**Figure 8.** Quantification of apoptotic cells by fluorescence microscopy after nuclei staining with Hoechst 33342: effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol on apoptosis induction. N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations including the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [4]: Ethanol (EtOH; 0.05%) and DMSO (0.05%); the highest concentrations of vehicles were only analyzed. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

#### 2.5. Flow Cytometric Analysis of the Impact of Aza-Stilbenes and Resveratrol on the Repartition of Cells in Different Phases of the Cell Cycle

Resveratrol has been described to induce a mode of cell death by apoptosis associated with an increase in the percentage of cells in the S phase of the cell cycle [28,29]. In addition, it has been well established that apoptosis can, in some cases, be associated with a population of cells in SubG1, resulting from inter-nucleosomal DNA fragmentation, when cell cycle analysis is performed by flow cytometry after PI staining [30,31]. The analysis of the cell cycle by flow cytometry and PI staining, which was realized on AZA-ST 1a–g and RSV-treated cells, therefore had two objectives: to define the percentage of cells in the different phases of the cell cycle and to demonstrate the presence or absence of a Sub-G1 peak. Cell cycle analysis was carried out at the IC50 concentrations of 6.25, 12.5, and 25  $\mu$ M (Figures 9 and 10).

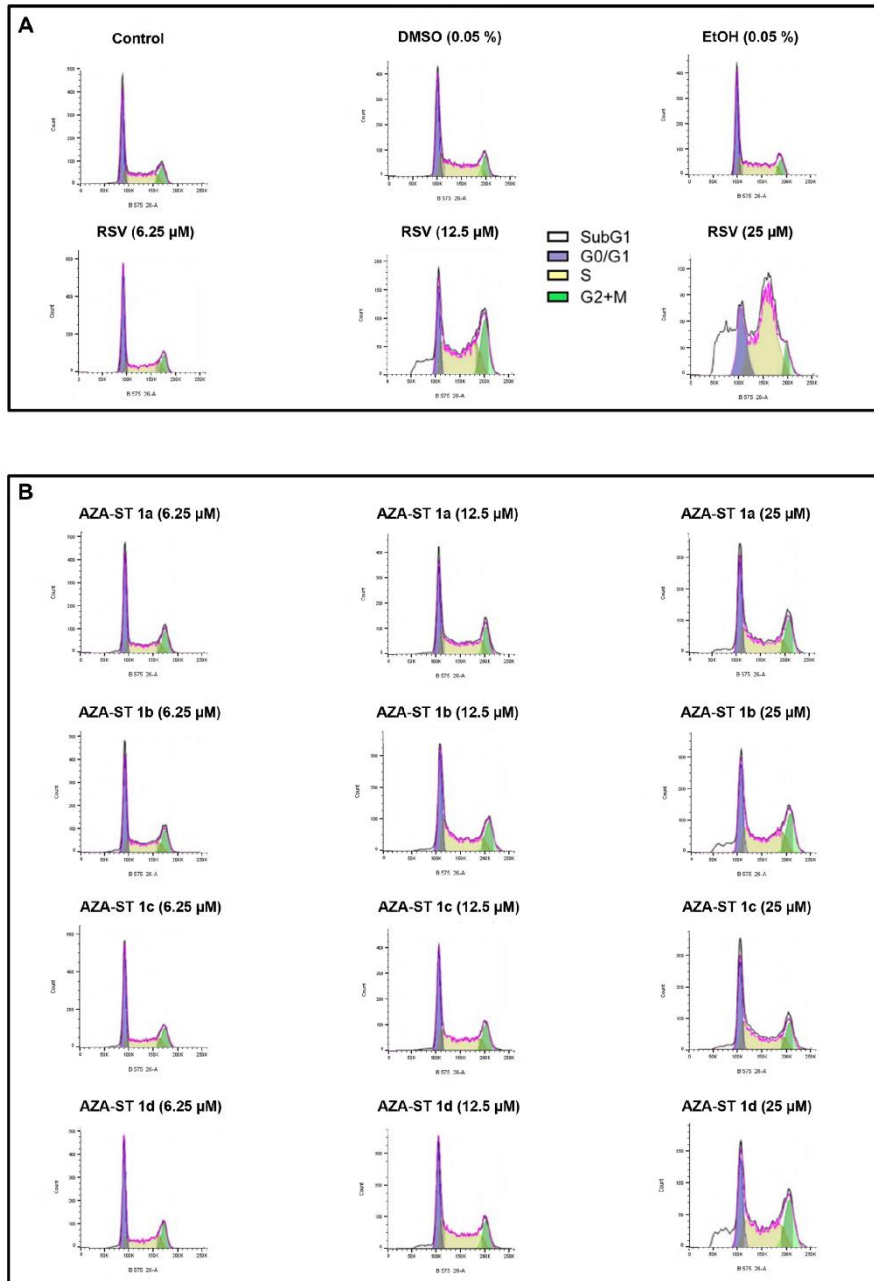
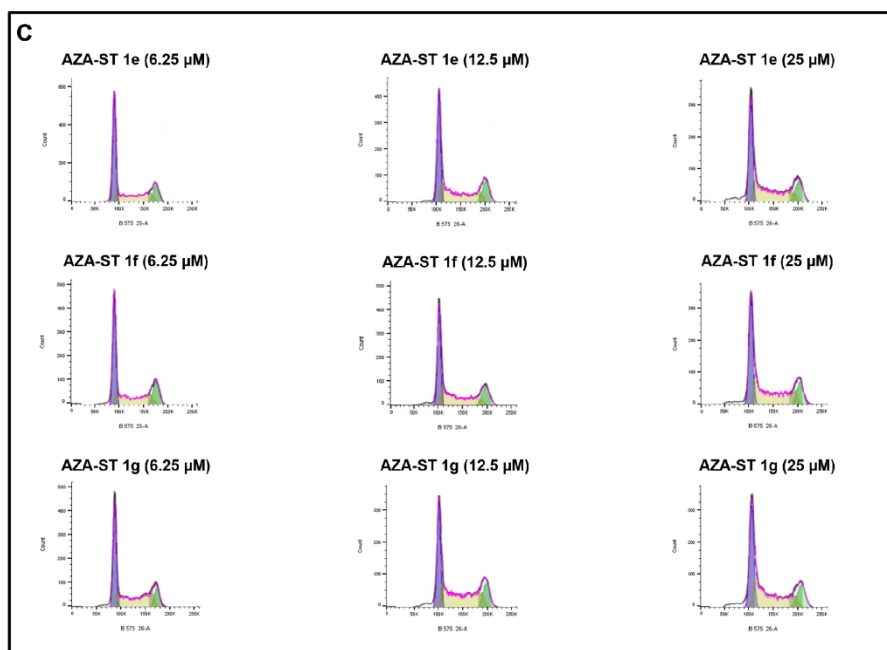


Figure 9. Cont.



**Figure 9.** Flow cytometric analysis of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle: effects of AZA-ST 1a–g and resveratrol. N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations including the IC50s (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). (A): Control, vehicles (DMSO and EtOH); (B): AZA-ST 1a–d; (C): AZA-ST-1e–g. Vehicles (Ethanol (EtOH) for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]: Ethanol (EtOH; 0.05%) and DMSO (0.05%); only the highest concentrations of vehicles were analyzed. White: SubG1; purple: G0/G1 phase; yellow: S phase; green: (G2 + M) phase.

In agreement with previous studies, important modifications of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle were observed with RSV: a strong increase of cells in the S-phase was shown, as well as a SubG1 peak, which is an apoptotic criterion.

Under treatment with AZA-ST 1a–g, the most important modifications were observed with AZA-ST 1b and 1d. A SubG1 peak, which supports the induction of apoptosis in agreement with the presence of condensed and/or fragmented nuclei, was observed (Figures 9 and 10). With the other aza-stilbenes, no modification or slight modification of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle was observed (Figures 9 and 10).

	Cell cycle phases			
	SubG1	G0/G1	S	G2+M
Control	1.3±0.1	37.2±0.8	47.5±1.3	14.0±1.2
EtOH (0.05%)	1.7±0.1	35.6±0.7	50.2±0.1	12.5±0.8
DMSO (0.05%)	1.2±0.1	37.6±1.0	48.0±0.7	13.2±0.6
Resveratrol (6.25 µM)	2.6±0.2	42.4±0.2 *	40.5±0.3 *	14.3±0.2
Resveratrol (12.5 µM)	10.5±1.0 *	17.4±1.5 *	46.8±1.0	25.3±1.8 *
Resveratrol (25 µM)	38.2±2.2 *	10.4±2.0 *	38.4±4.0 *	13.0±2.0
AZA-ST 1a (6.25 µM)	3.3±0.1	39.7±0.5 *	37.7±0.9 *	19.3±0.5 *
AZA-ST 1a (12.5 µM)	3.8±0.4	31.0±1.3 *	47.9±0.5	17.3±1.2 *
AZA-ST 1a (25 µM)	5.9±0.4 *	30.0±1.5 *	43.6±1.1 *	20.5±1.0 *
AZA-ST 1b (6.25 µM)	3.3±0.1	38.3±1.0	40.5±1.2 *	17.9±1.6 *
AZA-ST 1b (12.5 µM)	5.0±0.2	28.2±1.8 *	49±2.7	17.5±1.1 *
AZA-ST 1b (25 µM)	8.9±1.0 *	26.7±0.6 *	44.8±2.0 *	19.6±2.5 *
AZA-ST 1c (6.25 µM)	3.7±0.6	40.7±0.4 *	37.6±0.9 *	18.0±0.9 *
AZA-ST 1c (12.5 µM)	3.4±0.6	34.0±1.0	45.3±0.4	17.3±1.0 *
AZA-ST 1c (25 µM)	5.0±1.6	33.5±2.4 *	45.3±1.1	16.2±0.8
AZA-ST 1d (6.25 µM)	3.4±0.3	40.2±1.6 *	36.5±1.0 *	19.9±2.4 *
AZA-ST 1d (12.5 µM)	5.0±0.7	30.0±0.7 *	50.0±0.8 *	15.0±0.1
AZA-ST 1d (25 µM)	12.9±1.3 *	24.2±1.1 *	40.6±0.8 *	22.3±0.7 *
AZA-ST 1e (6.25 µM)	3.2±0.3	43.6±2.0 *	37.3±1.6 *	15.9±1.0
AZA-ST 1e (12.5 µM)	4.0±0.5	37.8±0.5	41.0±1.0 *	17.2±1.8 *
AZA-ST 1e (25 µM)	7.3±1.1 *	32.8±0.6 *	44.0±1.2 *	15.9±0.6
AZA-ST 1f (6.25 µM)	4.1±0.1 *	41.1±0.2 *	36.6±1.4 *	18.2±1.1 *
AZA-ST 1f (12.5 µM)	5.2±0.7	38.7±0.5	40.8±1.4 *	15.3±1.4
AZA-ST 1f (25 µM)	6.4±0.2 *	36.5±0.5	42.7±1.3 *	14.4±1.6
AZA-ST 1g (6.25 µM)	4.5±0.5	39.0±1.1	41.3±2.9 *	15.2±2.7
AZA-ST 1g (12.5 µM)	5.5±0.3 *	32.3±0.4 *	47.5±0.7	14.5±0.7
AZA-ST 1g (25 µM)	7.2±0.5 *	34.0±1.0	43.0±0.4 *	15.8±1.0

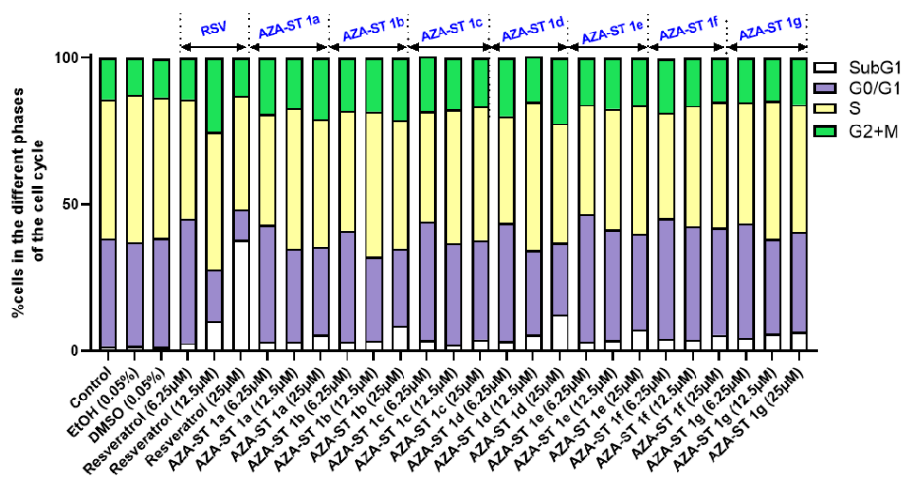


Figure 10. Quantification of the cells in SubG1 and in the different phases (G0/G1, S and (G2 + M)) of the cell cycle. N2a cells were incubated for 24 h with or without AZA-ST 1a–g or resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) at concentrations including the IC50s (6.25, 12.5 and 25 µM). Vehicles (Ethanol (EtOH)

for RSV; DMSO for AZA-ST) [15]; Ethanol (EtOH; 0.05%) and DMSO (0.05%); only the highest concentrations of vehicles were analyzed. White: SubG1; purple: G0/G1 phase; yellow: S phase; green: (G2 + M) phase. The data are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments performed in triplicate. The comparison of the data was performed with an ANOVA test followed by a Bonferroni test. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Discussion

*Trans*-resveratrol (RSV) is a polyphenol with multiple biological activities that can vary, particularly in vitro, depending on the concentrations used. At low concentrations, not exceeding 20  $\mu\text{M}$ , RSV has antioxidant activities, which can involve nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling through blockage of Kelch-like ECH Associated Protein 1 (Keap1) [32] and anti-inflammatory properties [33]. Regarding antioxidant activities, RSV, like all polyphenols, has phenolic hydroxyl groups, Ar (aromatic)—OH, which can supply H to L-OO $\bullet$  peroxy radicals and thus neutralize them in the form of L-OOH hydroxides [34]. RSV is also a potent senolytic compound that prevents the senescence involved in aging [35]. RSV also has neurotrophic activities (antioxidant and differentiating activities) on hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )—treated N2a cells [8,36]. On N2a cells, RSV also prevents cytotoxicity induced by 7KC and 7 $\beta$ -OHC, two oxysterols whose concentrations are strongly increased in several age-related diseases: cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, age-related macular degeneration (AMD), osteoporosis, and sarcopenia [25,37]. At high concentrations, from 50 to 100  $\mu\text{M}$ , RSV has potent anti-tumor activities by inducing death by apoptosis [26]. In addition, in vivo, RSV increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, and mice by stimulating the AMPK pathway and activating sirtuins [38–41]. One of the first studies of the effect of RSV on the lifespan was realized on a small, short-lived fish, the *Nothobranchius furzei* [42]. However, one of the main weaknesses of RSV is its rapid catabolism, both at the plasma level and by various bacteria at the intestinal level [11].

The synthesis of structural analogues is one of the possible strategies for the preservation of important RSV health properties and to oppose its catabolism. This led us to the synthesis of aza-stilbenes [15]. These molecules have shown cytotoxic activities on N2a cells in vitro and high anti-free radical properties when measured by various biochemical tests (DPPH, FRAP, and PAOT) and with the KRL assay performed in the presence of AAPH on red blood cells [15]. It is indeed possible that these compounds could be good candidates for anti-tumor activities in vivo and/or to limit the occurrence of age-related diseases frequently associated with a rupture of RedOx homeostasis leading to ROS overproduction, lipid peroxidation, protein carbonylation, DNA damage, and subsequently numerous cell damages. However, before realizing in vivo studies with AZA-STs, it is important to know more about their in vitro biological activities compared with those of RSV. Thus, in the present study performed on murine neuronal N2a cells, the impact of AZA-STs and RSV on ROS overproduction was studied, and the type of cell death induced by these molecules was also characterized. The synthesised AZA-STs, like RSV, induce cell death with IC50s in the range of 10  $\mu\text{M}$ , except for ASA-ST 1a, whose IC50 was 25  $\mu\text{M}$ . Moreover, all the AZA-STs studied induce a mode of cell death associated with oxidative stress. However, unlike RSV, which is a potent inducer of apoptosis, the AZA-STs are either weak inducers of apoptosis, such as AZA-ST 1b and 1d, or do not induce this type of cell death. Furthermore, while RSV induces apoptosis associated with an increase in the percentage of cells in the S phase of the cell cycle, no significant change in the distribution of the cells in the different phases of the cycle was observed with all AZA-STs studied.

Thus, with the crystal violet assay, which measures the amount of adherent cells after nuclei staining, the toxicity of the different synthesised AZA-STs was in the range of that of RSV (10  $\mu\text{M}$ ), with the exception of AZA-ST 1a, whose IC50 was 25  $\mu\text{M}$ . Differences in IC50 between RSV and AZA-ST (6.25 to 50  $\mu\text{M}$ ) were also observed when the cytotoxic effects were measured either by the FDA assay, which evaluates esterase activity, or by the SR101 assay, which allows determining the amount of adherent cells while taking into account the

total amount of protein [20,43]. Although these different tests (the crystal violet, FDA, and SR101 assays) measure different parameters, the IC<sub>50</sub> values found are of the same order of magnitude. Noteworthy, like RSV, the toxicity associated with AZA-ST is accompanied by a decrease in adherent cells, which can be attributed to a decrease in cell multiplication but also to a loss of cell adhesion also observed with quercetin and apigenin [8]. This toxicity is also accompanied by a decrease in esterase activity, supporting the alteration of the plasma membrane. These different effects, which are well documented for RSV, are therefore similar with AZA-STs.

Furthermore, the toxicity associated with AZA-STs and RSV leads to an increase in the permeability of cells to propidium iodide (PI), which is not only a criterion of cell death but also reflects a strong alteration of the plasma membrane [23,24]. These data agree with those obtained with the FDA test. The causes of this alteration of the plasma membrane could be due to oxidative stress, as the latter is known to alter the lipid components of the plasma membrane. This hypothesis agrees with the results obtained. Indeed, AZA-STs are all powerful inducers of oxidative stress, like RSV. In N2a cells, these molecules increase ROS overproduction on whole cells when measured by flow cytometry using dihydroethidium (DHE) staining, but also at the mitochondrial level when measured by flow cytometry after staining with MitoSox Red. The activation of oxidative stress could therefore be a key event leading to cell death under treatment with AZA-STs and RSV. At the mitochondrial level, a drop in transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) is also observed with the fluorochrome DiOC<sub>6</sub>(3), which is widely used in cell death studies due to its physicochemical properties (cationic and lipophilic dye that mainly accumulates in the mitochondrial membrane proportionally to the  $\Delta\Psi_m$  value) that make it a reliable tool for measuring transmembrane mitochondrial potential. In the cascade of events leading to cell death under treatment with AZA-STs, it will be further important to specify the chronology between oxidative stress and mitochondrial dysfunctions. Nevertheless, whatever the type of cell death, it is well established that the drop in  $\Delta\Psi_m$  represents a decisive and irreversible event in cell death induction [44].

In the case of RSV, this fall in  $\Delta\Psi_m$  is known to activate apoptosis. This is confirmed in the present study performed on N2a cells. In contrast, in the same cells treated with AZA-STs, a non-apoptotic mode of death was induced. With AZA-ST 1a, 1c, 1e, 1f, and 1g, a non-apoptotic cell death was observed. Indeed, compared to untreated cells and vehicle control cells, no increase in cells with condensed and/or fragmented nuclei (typical of apoptotic cells) was observed, and no SubG1 peak, considered an apoptotic criterion, was found. It is known that the SubG1 peak contains morphologically apoptotic cells with inter-nucleosomal fragmented DNA [30,45]. However, with AZA-ST 1b and 1d, a slight but significant increase in apoptotic cells was observed compared to untreated cells (the control) and vehicle-treated cells. These data support a mixed type of death with AZA-ST 1b and 1d: indeed, morphologically apoptotic cells represent only one third of dead cells measured by PI staining, which allows to determine the total number of dead cells. Interestingly, under treatment with AZA-ST 1b and 1d, as well as in the presence of RSV, which are pro-apoptotic molecules, apoptosis was simultaneously characterized by the presence of cells with condensed and/or fragmented nuclei and by a SubG1 peak revealed by flow cytometry. The simultaneous presence of these two apoptotic criteria is not systematic with pro-apoptotic drugs [31]. However, only RSV-induced cell death was associated with an increase in the percentage of cells in the S phase of the cell cycle. Whatever the AZA-ST considered, no modification of the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle was observed. With AZA-STs, at the opposite of RSV, an effect on cyclin-dependent kinases (CDKs) [46] or cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) [47] involved in the regulation of cell cycle is therefore unlikely.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemistry

Aza-stilbenes were synthesized by a one-step condensation reaction between aromatic aldehydes and primary aromatics, as we previously described [15]. For the chemical characterization of all imine analogs synthesized (AZA-ST 1a–g), we have carried out <sup>1</sup>H, COSY, and NOESY NMR experiments of all compounds to assign chemical shifts of aromatic protons as well as <sup>13</sup>C, jmod, HSQC, and HMBC NMR experiments to highlight coupling between the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclei [15]. The <sup>1</sup>H (500 MHz), <sup>13</sup>C (126 MHz) NMR, and HMBC-NMR spectra of the seven aza-stilbenes synthesized and of *trans*-resveratrol have been realized [15].

### 4.2. Cell Culture and Treatments

The mouse neuro-2a (N2a) neuroblastoma cell line (Ref: CCL-131, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) was cultured as previously described [15]. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Lonza, Amboise, France), which contains 10% (*v/v*) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 1% (*v/v*) of penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL) (Pan Biotech). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) and passaged twice a week. The cells were seeded at 60,000 cells per well containing 1 mL of DMEM supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated FBS and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin) in 24-well plates (FALCON, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The stock solutions of resveratrol (RSV; *trans*-resveratrol) and of imine analogs (aza-stilbenes (AZA-ST) 1a–g) were prepared as follows: *trans*-resveratrol (RSV) (reference of the product: 501-36-0; purity 99%; Sigma-Aldrich, St. Quentin-Fallavier, France) was prepared at 50 mM in absolute ethanol (EtOH; 98%; Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France); AZA-ST 1a–g was prepared at 50 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). In order to evaluate the effects of AZA-ST 1a–g on N2a cells compared to RSV, the growth medium was removed after 24 h of culture, and the N2a cells were incubated either with resveratrol or AZA-ST 1a–g at various concentrations ranging from 1.5 to 100 μM for 48 h. The highest concentration of 100 μM is obtained by diluting 16 μL of stock solution (RSV or AZA-ST; stock solution at 50 mM) in 8 mL of culture medium. Concentrations of 100 to 1.5 μM are obtained by successive dilution in a two-by-two cascade in culture medium. The effects of vehicles (DMSO, ethanol (EtOH)) were evaluated at their highest concentration (0.2% *v/v* when the highest concentrations of RSV and AZA-ST used were 100 μM; 0.05% *v/v* when the highest concentrations of RSV and AZA-ST used were 25 μM). RSV was prepared at 50 mM in absolute ethanol (EtOH 98%). Therefore, when RSV is used at 25 μM, the final concentration of EtOH is around 0.05% (0.049%); when RSV is used at 100 μM, the final concentration of EtOH is around 0.2% (0.196%). AZA-ST were prepared at 50 mM in DMSO (pure, 100%). Therefore, when AZA-ST are used at 25 μM, the final concentration of DMSO is 0.05%; when AZA-ST are used at 100 μM, the final concentration of DMSO is 0.2%.

### 4.3. Staining with Crystal Violet

The quantification of adherent cells was estimated by staining with crystal violet [20]. Cells were seeded in triplicates in 6-well plates and cultured without or with imine analogs of *trans*-resveratrol (aza-stilbenes) or with *trans*-resveratrol (RSV: 1.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM) for 48 h. At the end of treatment, cells were washed with PBS, stained with crystal violet for 5 min (Sigma-Aldrich), and then rinsed with water. Absorbance was read at 570 nm after extraction of the dye with 0.1 mol/L sodium citrate in 50% ethanol.

### 4.4. Evaluation of Cell Morphology by Phase Contrast Microscopy

After 48 h of treatment with or without imine analogs of *trans*-resveratrol (aza-stilbenes) or with *trans*-resveratrol (6.25, 12.5 and 25 μM), the cell morphology and cell density of N2a cells were observed and photographed using a phase-contrast microscope



(Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (AxioCam ICm1, Zeiss).

#### 4.5. Nuclei Staining with Hoechst 33342

The nuclear morphology of control (untreated cells) and treated cells cultured without or with AZA-ST or *trans*-resveratrol (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M) for 48 h was characterized as previously described by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (2  $\mu$ g/mL) [23,48]. Cell deposits of about 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark), and stored in the dark at 4 °C until observation. The morphological aspect of the cell nuclei was determined with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss). For each sample, 300 cells were examined.

#### 4.6. Measurement of Plasma Membrane Permeability with Propidium Iodide

Propidium iodide (PI) was used to evaluate the plasma membrane permeability and cell death, as previously described [21]. This dye penetrates cells with damaged plasma membranes, which are considered dead cells [24]. After 48 h of treatment with or without AZA-ST 1a-g or *trans*-resveratrol, N2a cells (adherent and non-adherent cells) were stained with a PI solution (1  $\mu$ g/mL of PBS) for 5 min at 37 °C, and then immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The red fluorescence was selected on a 630 nm band-pass filter, and 10,000 cells were acquired for each sample. Data analyses were performed using FlowJo v10.8.1 software (Tree Star Inc., Carrboro, NC, USA).

#### 4.7. Flow Cytometric Evaluation of Transmembrane Mitochondrial Potential by Staining with Dihexyloxacarbocyanine Iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))

The variation of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ m) was measured using 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)) (D273, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France). This fluorochrome accumulates in the mitochondria proportionally to the  $\Delta\Psi$ m value [49]. The higher the  $\Delta\Psi$ m, the more the probe accumulates. After 48 h of treatment, adherent cells collected by trypsinization were pooled with non-adherent cells and stained with a solution of DiOC<sub>6</sub>(3) at 40 nM (15 min; 37 °C). The cells were immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The loss of  $\Delta\Psi$ m is indicated by a decrease in the intensity of the green fluorescence collected through a band pass filter of 520  $\pm$  10 nm. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analyzed with the FlowJo v10.8.1 software (Tree Star Inc.). All assays were performed in triplicate.

#### 4.8. Measurement of Reactive Oxygen Species Production with Dihydroethidium

Reactive oxygen species (ROS) production, including superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) production, was measured by flow cytometry after staining with dihydroethidium (DHE) as previously described [21]. DHE is a dye that can freely diffuse across cell membranes; it is rapidly oxidized under the action of ROS to fluorescent ethidium. This latter exhibits an orange/red fluorescence ( $\lambda$ Ex max = 488 nm;  $\lambda$ Em max = 575 nm). After 48 h of treatment, N2a cells (adherent and non-adherent cells) were stained with a 2  $\mu$ M DHE solution for 15 min at 37 °C and immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The fluorescent signals of the DHE-stained cells were collected through a 580 nm band-pass filter, and 10,000 cells were acquired for each sample. Data analyses were performed using FlowJo v10.8.1 software (Tree Star Inc.).

#### 4.9. Measurement of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production with MitoSox-Red

Mitochondrial production of ROS, including superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), was quantified by flow cytometry after staining with MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific). This pos-

itively charged probe accumulates in the mitochondria [50] and exhibits an orange/red fluorescence ( $\lambda$  Ex Max = 510 nm;  $\lambda$  Em Max = 580 nm). MitoSox Red stock solution was prepared at 5 mM in PBS and used at 5  $\mu$ M in the cells. After cell treatments, adherent and non-adherent cells were pooled by trypsinization and incubated with MitoSox Red for 15 min at 37 °C. The fluorescent signals were collected through a 580  $\pm$  20 nm band pass filter on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). For each sample, 10,000 cells were acquired. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analyzed with FlowJo v10.8.1 software (Tree Star Inc.). All assays were performed in triplicate.

#### 4.10. Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle after DNA Staining with Propidium Iodide

Dead and live cells were collected in a tube by trypsinization with a 1X trypsin solution and washed twice with 1X PBS. The cell pellet (around 4–5  $\times$  10<sup>6</sup> cells) was then suspended in 1 mL of ice-cold 80% ethanol to fix the cells, which were stored for 2 h at 4 °C [22]. Briefly, the fixed cells were then rehydrated by two washes in 1X PBS and resuspended in 300–400  $\mu$ L of a solution containing 1X PBS, propidium iodide (PI, 80  $\mu$ g/mL), and ribonuclease RNase A (200  $\mu$ g/mL) for one hour at 37 °C. After incubation, stained cells were immediately analyzed by flow cytometry, and the red fluorescence was collected and quantified on a long-pass filter at 630 nm. The red fluorescence was measured on a linear scale considering 10,000 cells. The percentage of cells in the different phases of the cell cycle was determined using modeling software for cell cycle data (FlowJo\_v10.8.1; Tree Star Inc., Carrboro, NC, USA).

#### 4.11. Statistical Analysis

Statistical analyses of experimental results were performed using the GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The comparison of in vitro data was performed through an ANOVA test followed by a Bonferroni test, allowing multiple comparisons to evaluate any interaction. (\*):  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## 5. Conclusions

In conclusion, our study brings new information on the cytotoxic properties of AZA-STs: (a) These molecules are cytotoxic and have a concentration range close to that of RSV; (b) like RSV, AZA-STs induce a strong oxidative stress both on whole cells and at the mitochondrial level; (c) unlike RSV, AZA-STs are either not or only weakly pro-apoptotic inducers; (d) unlike RSV, AZA-STs do not trigger an increase in the percentage of cells in the S phase of the cell cycle. In agreement with our previous study, which focused on the anti-oxidant properties of AZA-STs [15], our data bring new information supporting the idea that all AZA-STs synthesized have both different biochemical and biological properties. RSV is also known for its effects on immune cells [51] and on different signaling pathways involved in cell metabolism [52]. Additional studies of AZA-STs in these areas will deserve to be determined since cancer immunotherapy and metabolic therapy of cancer are future strategies of anti-tumor therapy.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.L., A.V., D.V.-F. and T.G.; methodology and biology: M.K., V.P., I.G. and G.L.; chemistry: D.V.-F.; formal analysis, G.L. and D.V.-F.; investigation, M.K. and V.P.; resources, G.L., T.G., D.V.-F. and O.M.-K.; data curation, G.L.; writing—original draft preparation, G.L., M.K., I.G., A.V., N.L. and D.V.-F.; writing—review and editing, G.L. and M.K.; supervision, G.L.; project administration, G.L. and T.G.; funding acquisition, D.V.-F., T.G., A.V., N.L. and G.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the University of Bourgogne (Dijon, France) (G.L., A.V., D.V.-F.) and the University Tunis El Manar (Tunis, France) (M.K., T.G., O.M.-K.), the Région Bourgogne Franche-Comté (Projet MEDICTA, Appel à Projet Région 2020, G.L., A.V., D.V.-F.), and the Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne ICMUB UMR CNRS 6302 (D.V.-F.). M.K. received financial support from PHC Utique (G.L. and T.G., 2021–2023; code CMCU22G0809/code Campus France 47608VJ).

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

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are available at the Institute of Molecular Chemistry of the University of Bourgogne (ICMUB UMR CNRS 6302; Dijon, France) and at Laboratory Bio-peroxIL (University of Bourgogne/Inserm, Dijon, France).

**Acknowledgments:** I.G. received financial support from the Nutrition Méditerranéenne et Santé Association (NMS; President Emeritus Norbert Latruffe (N.L.)) and the Institut Européen des Antioxydants (IEA; CEO: Smail Meziane; Neuves Maisons, France). I.G. and Mohamed M.K. received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine; Dijon, France). G.L. is a member of the International Natural Product Sciences Taskforce (INPST: <https://inpst.net/> (accessed on 17 February 2023)). G.L. and N.L. are members of the international network of the UNESCO Chair 'Culture and Tradition of Wine' (<http://chaireunesco-vinetculture.u-bourgogne.fr/> (accessed on 17 February 2023)).

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

**Sample Availability:** Samples of the compounds aza-stilbenes (AZA-STs) and *trans*-resveratrol (RSV) are available upon request from the authors.

## References

- Kiani, A.K.; Medori, M.C.; Bonetti, G.; Aquilanti, B.; Velluti, V.; Matera, G.; Iaconelli, A.; Stuppia, L.; Connelly, S.T.; Herbst, K.L.; et al. Modern vision of the Mediterranean diet. *J. Prev. Med. Hyg.* **2022**, *63*, E36–E43. [\[CrossRef\]](#)
- Naureen, Z.; Dhuli, K.; Donato, K.; Aquilanti, B.; Velluti, V.; Matera, G.; Iaconelli, A.; Bertelli, M. Foods of the Mediterranean diet: Tomato, olives, chili pepper, wheat flour and wheat germ. *J. Prev. Med. Hyg.* **2022**, *63*, E4–E11. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, L.; Han, Z.; Granato, D. Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Adv. Food Nutr. Res.* **2021**, *98*, 1–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wang, Q.; Yu, Q.; Wu, M. Antioxidant and neuroprotective actions of resveratrol in cerebrovascular diseases. *Front. Pharm.* **2022**, *13*, 948889. [\[CrossRef\]](#)
- Lalani, A.R.; Fakhari, F.; Radgoudarzi, S.; Rastegar-Pouyani, N.; Moloudi, K.; Khodamoradi, E.; Taeb, S.; Najafi, M. Immunoregulation by resveratrol; implications for normal tissue protection and tumour suppression. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* **2023**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jang, J.Y.; Im, E.; Kim, N.D. Mechanism of Resveratrol-Induced Programmed Cell Death and New Drug Discovery against Cancer: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13689. [\[CrossRef\]](#)
- Pyo, I.S.; Yun, S.; Yoon, Y.E.; Choi, J.W.; Lee, S.J. Mechanisms of Aging and the Preventive Effects of Resveratrol on Age-Related Diseases. *Molecules* **2020**, *25*, 4649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Namsi, A.; Nury, T.; Hamdouni, H.; Yammine, A.; Vejux, A.; Vervandier-Fasseur, D.; Latruffe, N.; Masmoudi-Kouki, O.; Lizard, G. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Diseases* **2018**, *6*, 67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ghzaïel, I.; Sassi, K.; Zarrouk, A.; Ghosh, S.; Dias, I.H.K.; Nury, T.; Ksila, M.; Essadek, S.; Tahri Joutey, M.; Brahmi, F.; et al. Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: Food and biomedical applications. *Redox Exp. Med.* **2022**, *2022*, R40–R56. [\[CrossRef\]](#)
- Anderson, A.; Campo, A.; Fulton, E.; Corwin, A.; Jerome, W.G., 3rd; O'Connor, M.S. 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biol.* **2020**, *29*, 101380. [\[CrossRef\]](#)
- Yammine, A.; Namsi, A.; Vervandier-Fasseur, D.; Mackrill, J.J.; Lizard, G.; Latruffe, N. Polyphenols of the Mediterranean Diet and Their Metabolites in the Prevention of Colorectal Cancer. *Molecules* **2021**, *26*, 3483. [\[CrossRef\]](#)
- Bellina, F.; Guazzelli, N.; Lessi, M.; Manzini, C. Imidazole analogues of resveratrol: Synthesis and cancer cell growth evaluation. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2298–2305. [\[CrossRef\]](#)
- Li, C.; Xu, X.; Wang, X.J.; Pan, Y. Imine resveratrol analogues: Molecular design, Nrf2 activation and SAR analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101455. [\[CrossRef\]](#)
- Bae, S.J.; Ha, Y.M.; Kim, J.-A.; Park, J.Y.; Ha, T.K.; Park, D.; Chun, P.; Park, N.H.; Moon, H.R.; Chung, H.Y. A Novel Synthesized Tyrosinase Inhibitor: (E)-2-((2,4-Dihydroxyphenyl)diazanyl)phenyl 4-Methylbenzenesulfonate as an Azo-Resveratrol Analog. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 65–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ksila, M.; Vejux, A.; Prost-Camus, E.; Durand, P.; Ghzaïel, I.; Nury, T.; Duprey, D.; Meziane, S.; Masmoudi-Kouki, O.; Latruffe, N.; et al. Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 4713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lizard, G.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D. Aza- and Azo-Stilbenes: Bio-Isosteric Analogs of Resveratrol. *Molecules* **2020**, *25*, 605. [\[CrossRef\]](#)

17. Rana, M.; Cho, H.J.; Roy, T.K.; Mirica, L.M.; Sharma, A.K. Azo-dyes based small bifunctional molecules for metal chelation and controlling amyloid formation. *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *471*, 419–429. [[CrossRef](#)]
18. Biscussi, B.; Richmond, V.; Baier, C.J.; Mañez, P.A.; Murray, A.P. Design and Microwave-Assisted Synthesis of Aza-Resveratrol Analogs with Potent Cholinesterase Inhibition. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2020**, *19*, 630–641. [[CrossRef](#)]
19. Siddiqui, A.; Dandawate, P.; Rub, R.; Padhye, S.; Aphale, S.; Moghe, A.; Jagyasi, A.; Venkateswara Swamy, K.; Singh, B.; Chatterjee, A.; et al. Novel Aza-resveratrol analogs: Synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 635–640. [[CrossRef](#)]
20. Namsi, A.; Nury, T.; Khan, A.S.; Leprince, J.; Vaudry, D.; Caccia, C.; Leoni, V.; Atanasov, A.G.; Tonon, M.C.; Masmoudi-Kouki, O.; et al. Octadecaneuropeptide (ODN) Induces N2a Cells Differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-Dependent Pathway: Incidence on Peroxisome, Mitochondria, and Lipid Profiles. *Molecules* **2019**, *24*, 3310. [[CrossRef](#)]
21. Ghzaïel, I.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Libergoli, M.; Florio, F.; Hammouda, S.; Ménétrier, F.; Avoscan, L.; Yammine, A.; Samadi, M.; et al. Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia lentiscus L. Seed Oil against 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. *Antioxid* **2021**, *10*, 1772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kharroubi, W.; Nury, T.; Ahmed, S.H.; Andreoletti, P.; Sakly, R.; Hammami, M.; Lizard, G. Induction by arsenate of cell-type-specific cytotoxic effects in nerve and hepatoma cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **2017**, *36*, 1256–1269. [[CrossRef](#)]
23. Lizard, G.; Fournel, S.; Genestier, L.; Dhedin, N.; Chaput, C.; Flacher, M.; Mutin, M.; Panaye, G.; Revillard, J.P. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* **1995**, *21*, 275–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yeh, C.J.; Hsi, B.L.; Faulk, W.P. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J. Immunol. Methods* **1981**, *43*, 269–275. [[CrossRef](#)]
25. Nury, T.; Yammine, A.; Ghzaïel, I.; Sassi, K.; Zarrouk, A.; Brahmi, F.; Samadi, M.; Rup-Jacques, S.; Vervandier-Fasseur, D.; Pais de Barros, J.P.; et al. Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced oxiaoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils: Potential for the prevention of age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *68*, 101324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Delmas, D.; Solary, E.; Latruffe, N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: Apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1100–1121. [[CrossRef](#)]
27. Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146*, 3–15.
28. 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. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 538–548. [[CrossRef](#)]
29. Colin, D.; Gimazane, A.; Lizard, G.; Izard, J.C.; Solary, E.; Latruffe, N.; Delmas, D. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2780–2788. [[CrossRef](#)]
30. Ormerod, M.G.; Collins, M.K.; Rodriguez-Tarduchy, G.; Robertson, D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J. Immunol. Methods* **1992**, *153*, 57–65. [[CrossRef](#)]
31. Fournel, S.; Genestier, L.; Rouault, J.P.; Lizard, G.; Flacher, M.; Assossou, O.; Revillard, J.P. Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS Lett.* **1995**, *367*, 188–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Farkhondeh, T.; Folgado, S.L.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Ashrafizadeh, M.; Samarghandian, S. The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed. Pharm.* **2020**, *127*, 110234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yammine, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Greige-Gerges, H.; Auezova, L.; Lizard, G. Prevention of 7-Ketocholesterol-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death with Major Nutrients (Polyphenols,  $\omega$ 3 and  $\omega$ 9 Unsaturated Fatty Acids) of the Mediterranean Diet on N2a Neuronal Cells. *Molecules* **2020**, *25*, 2296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cai, Y.J.; Wei, Q.Y.; Fang, J.G.; Yang, L.; Liu, Z.L.; Wyche, J.H.; Han, Z. The 3,4-dihydroxyl groups are important for trans-resveratrol analogs to exhibit enhanced antioxidant and apoptotic activities. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 999–1002.
35. Russo, G.L.; Spagnuolo, C.; Russo, M.; Tedesco, I.; Moccia, S.; Cervellera, C. Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. *Biochem. Pharm.* **2020**, *173*, 113719. [[CrossRef](#)]
36. Uddin, M.S.; Al Mamun, A.; Kabir, M.T.; Ahmad, J.; Jeandet, P.; Sarwar, M.S.; Ashraf, G.M.; Aleya, L. Neuroprotective role of polyphenols against oxidative stress-mediated neurodegeneration. *Eur. J. Pharm.* **2020**, *886*, 173412. [[CrossRef](#)]
37. Rezig, L.; Ghzaïel, I.; Ksila, M.; Yammine, A.; Nury, T.; Zarrouk, A.; Samadi, M.; Chouaibi, M.; Vejux, A.; Lizard, G. Cytoprotective activities of representative nutrients from the Mediterranean diet and of Mediterranean oils against 7-ketocholesterol- and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced cytotoxicity: Application to age-related diseases and civilization diseases. *Steroids* **2022**, *187*, 109093. [[CrossRef](#)]
38. Houtkooper, R.H.; Mouchiroud, L.; Ryu, D.; Moullan, N.; Katsyuba, E.; Knott, G.; Williams, R.W.; Auwerx, J. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **2013**, *497*, 451–457. [[CrossRef](#)]
39. Wood, J.G.; Rogina, B.; Lavu, S.; Howitz, K.; Helfand, S.L.; Tatar, M.; Sinclair, D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **2004**, *430*, 686–689. [[CrossRef](#)]
40. Picard, F.; Kurtev, M.; Chung, N.; Topark-Ngarm, A.; Senawong, T.; Machado De Oliveira, R.; Leid, M.; McBurney, M.W.; Guarente, L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **2004**, *429*, 771–776. [[CrossRef](#)]


41. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Terzibasi, E.; Valenzano, D.R.; Cellarino, A. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Exp. Gerontol.* **2007**, *42*, 81–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yammine, A.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Mackrill, J.J.; Greige-Gerges, H.; Auezova, L.; et al. Prevention by Dietary Polyphenols (Resveratrol, Quercetin, Apigenin) Against 7-Ketocholesterol-Induced Oxiaoptophagy in Neuronal N2a Cells: Potential Interest for the Treatment of Neurodegenerative and Age-Related Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kroemer, G. Mitochondrial control of apoptosis. *Bull. Acad. Natl. Med.* **2001**, *185*, 1135–1142; discussion 1143. [[CrossRef](#)]
45. Kajstura, M.; Halicka, H.D.; Pryjma, J.; Darzynkiewicz, Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytom. Part A J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2007**, *71*, 125–131. [[CrossRef](#)]
46. Meeran, S.M.; Katiyar, S.K. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 2191–2202. [[CrossRef](#)]
47. Russo, G.L.; Stampone, E.; Cervellera, C.; Borriello, A. Regulation of p27(Kip1) and p57(Kip2) Functions by Natural Polyphenols. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1316. [[CrossRef](#)]
48. Zarrouk, A.; Nury, T.; Karym, E.M.; Vejux, A.; Sghaier, R.; Gondcaille, C.; Andreoletti, P.; Trompier, D.; Savary, S.; Cherkaoui-Malki, M.; et al. Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N murine oligodendrocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *169*, 29–38. [[CrossRef](#)]
49. Ragot, K.; Mackrill, J.J.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Aires, V.; Jacquin, A.; Athias, A.; Pais de Barros, J.P.; Vejux, A.; Riedinger, J.M.; et al. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharm.* **2013**, *86*, 67–79. [[CrossRef](#)]
50. Sghaier, R.; Nury, T.; Leoni, V.; Caccia, C.; Pais De Barros, J.P.; Cherif, A.; Vejux, A.; Moreau, T.; Limem, K.; Samadi, M.; et al. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *194*, 105432. [[CrossRef](#)]
51. Delmas, D.; Hermetet, F.; Aires, V. PD-1/PD-L1 Checkpoints and Resveratrol: A Controversial New Way for a Therapeutic Strategy. *Cancers* **2021**, *13*, 4509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Delmas, D.; Aires, V.; Colin, D.J.; Limagne, E.; Scagliarini, A.; Cotte, A.K.; Ghiringhelli, F. Importance of lipid microdomains, rafts, in absorption, delivery, and biological effects of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1290*, 90–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

**Note:** These proofs may contain color figures. Those figures may print black and white in the final printed book if a color print product has not been planned. The color figures will appear in color in all electronic versions of this book.

## AUTHOR QUERY FORM

	<b>Book:</b> Ostojic-MNM-1633385 <b>Chapter:</b> CH007	<b>Please e-mail your responses and any corrections to:</b> <b>E-mail:</b> <a href="mailto:omer.m@elsevier.com">omer.m@elsevier.com</a>
---	---	--

Dear Author,

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and are highlighted by flags in the proof. (AU indicates author queries; ED indicates editor queries; and TS/TY indicates typesetter queries.) Please check your proof carefully and answer all AU queries. Mark all corrections and query answers at the appropriate place in the proof using on-screen annotation in the PDF file. For a written tutorial on how to annotate PDFs, click [https://www.elsevier.com/\\_data/assets/pdf\\_file/0004/475249/Annotating-PDFs-Adobe-Reader-9-X-or-XL.pdf](https://www.elsevier.com/_data/assets/pdf_file/0004/475249/Annotating-PDFs-Adobe-Reader-9-X-or-XL.pdf). A video tutorial is also available at <http://www.screencast.com/t/9OIDFhngE9a>. Alternatively, you may compile them in a separate list and tick off below to indicate that you have answered the query.

**Please return your input as instructed by the project manager.**

<b>Uncited references:</b> References that occur in the reference list but are not cited in the text. Please position each reference in the text or delete it from the reference list.	
<b>Missing references:</b> References listed below were noted in the text but are missing from the reference list. Please make the reference list complete or remove the references from the text.	
<b>Location in Article</b>	<b>Query / remark</b>

No Query

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## CHAPTER

# Analysis of the mitochondrial status of murine neuronal N2a cells treated with resveratrol and synthetic isomeric resveratrol analogs: aza-stilbenes

## 7

c0007

Mohamed Ksila<sup>1,2</sup>, Imen Ghzaïel<sup>1,3,4</sup>, Aline Yammine<sup>1</sup>, Thomas Nury<sup>1</sup>, Anne Vejux<sup>1</sup>, Dominique Vandier-Fasseur<sup>5</sup>, Norbert Latruffe<sup>1</sup>, Emmanuelle Prost-Camus<sup>6</sup>, Smail Meziane<sup>7</sup>, Olfa Masmoudi-Kouki<sup>2</sup>, Amira Zarrouk<sup>3,8</sup>, Taoufik Ghraïri<sup>2</sup> and Gérard Lizard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Team "Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism", University Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>2</sup>Laboratory of Neurophysiology, Department of Biologie, Faculty of Sciences, Cellular Physiopathology and Valorisation of BioMolecules, University Tunis-El Manar, Tunis, Tunisia

<sup>3</sup>Lab-NAFS "Nutrition—Functional Food & Vascular Health," Faculty of Medicine, University of Monastir, Monastir, Tunisia

<sup>4</sup>Faculty of Sciences of Tunis, University Tunis-El Manar, Tunis, Tunisia

<sup>5</sup>Team OCS, Institute of Molecular Chemistry of University of Burgundy (ICMUB UMR CNRS 6302), University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>6</sup>LARA-Spiral Laboratories, Couernon, France

<sup>7</sup>Institut Européen des Antioxydants, Neuves-Maisons, France

<sup>8</sup>University of Sousse, Faculty of Medicine, Sousse, Tunisia

## 7.1 Introduction

s0010

Polyphenols are a family of organic molecules widely present in the plant kingdom. They are characterized by the presence of phenolic groups (Bertelli et al., 2021). Polyphenols are subdivided into two classes of molecules: flavonoids and nonflavonoids (Jimenez-Del-Rio & Velez-Pardo, 2015) (Fig. 7.1). Among the flavonoids, two subclasses are distinguished: anthocyanins and anthoxanthins. The latter includes flavonols (quercetin, myricetin, kaempferol), flavanones (maringenin, hesperetin), flavanols (catechin), flavones (apigenin, luteolin) and isoflavones (genistein, daidzein). The nonflavonoids include phenolic acids (p-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, and gallic acid), stilbenes, and lignans. Among the

Molecular Nutrition and Mitochondria. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90256-4.00023-0>  
© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

195

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

196 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine

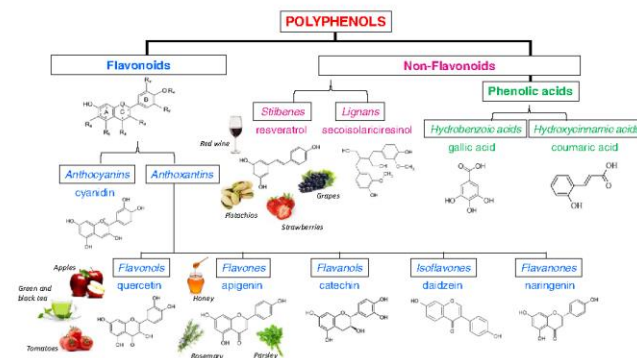


FIGURE 7.1  
Classification of polyphenols.

stilbenes, resveratrol is one of the most studied molecules because of its physico-chemical characteristics and its different biological activities, which vary according to the concentration used. Thus, resveratrol (under its trans configuration) is a powerful antioxidant capable of neutralizing reactive oxygen and nitrogen species, but it is also a metal chelator, which contributes to its antioxidant activities (Rodrigo & Bosco, 2006; Rodrigo et al., 2011). Resveratrol also attenuates the cytotoxic activities of cholesterol oxide derivatives such as 7-ketocholesterol which is increased in patients with age related diseases (Dugas et al., 2010; Yammine et al., 2020). In vitro and in vivo, the trans form of resveratrol, which is biologically active, has several biological activities: antiaging activities, protective activities against some age-related diseases (e.g., cardiovascular diseases, age-related macular degeneration), and antitumor activities (Silva et al., 2019; Vervandier-Fasseur & Latruffe, 2019). Furthermore, trans-resveratrol also has neurotrophic properties, defined as antioxidant and pro-differentiating activities on nerve cells (Uddin et al., 2020, 2021), which make it possible to envisage its use in the treatment of certain neurodegenerative diseases where oxidative stress is increased in association with a decrease in functional mature neurons as is the case in Parkinson's and Alzheimer's disease (Fukutomi et al., 2021; Namsi et al., 2018). Trans-resveratrol's differentiating activities have also been described on C2C12 murine myoblasts, suggesting that trans-resveratrol can also be of interest in the prevention and/or treatment of sarcopenia, which is a highly disabling muscle weakness in the elderly due to the loss of autonomy it causes (Kaminski et al., 2012). Despite its attractive physico-chemical characteristics and biological activities, trans-resveratrol has the disadvantage of being rapidly metabolized both at the intestinal level under the influence of



the microbiota and at the blood level (Yammine et al., 2021). Consequently, the moderate bioavailability for trans-resveratrol prompted the investigation of innovative and relevant synthetic trans-resveratrol derivatives. In this context, isosteric analogs of trans-resveratrol have been synthesized with the aim of obtaining compounds whose catabolism is less important than that of trans-resveratrol. These are isosteric analogs of trans-resveratrol, aza-stilbenes, and azo-stilbenes in which the C = C bond between both aromatic rings was replaced with C = N or N = N bonds, respectively (Lizard et al., 2020).

p0015 Similar to trans-resveratrol, aza- and azo-stilbenes may have a therapeutic interest for Alzheimer's disease. These molecules oppose the aggregation of  $\beta$ -amyloid proteins considered as determining factors in neurodegeneration (Rana et al., 2018) and also inhibit cholinesterases (Biscussi et al., 2020). However, in Alzheimer's disease, the increase in the activity of these enzymes leads to decreases in acetylcholine associated with cognitive decline and behavioral disorders (Giacobini et al., 2022). As it has been reported with trans-RSV, iron chelating activities have also been described with azo-stilbenes suggesting that these molecules have cytoprotective activities against ferroptosis (Rana et al., 2018), an iron-induced type of cell death considered to play a major role in neuronal loss in Alzheimer's patients (Jakaria et al., 2021). In addition, like trans-resveratrol, anti-tumor activities of aza- and azo-stilbenes have been described (Siddiqui et al., 2013) as well as differentiating activities of azo-stilbenes on human HL-60 promyelocytic leukemia cells (Kagechika et al., 1985). On the other hand, studies comparing the effects of aza- and azo-stilbenes vs. those of trans-resveratrol at the mitochondrial level have not yet been carried out. A better understanding of the effects of aza- and azo-stilbenes at the mitochondrial level is an important point since this organelle is involved both in the control of RedOx equilibrium and in cell metabolism, which play major roles in neurodegeneration and cell death induction (Fransen et al., 2020; Lismont et al., 2015).

p0020 In the present study, aza-stilbenes were synthesized (AZA ST I to VII) and their cytotoxic effects were compared to those of resveratrol, under its trans configuration, using murine neuronal N2a cells. The effects on cell viability were quantified by two complementary assays: the fluorescein diacetate (FDA) assay, which is a cell viability assay based on measuring esterase activity (Namsi et al., 2018), and the crystal violet assay which measures the density of adherent cells (Namsi et al., 2019; Vega-Avila & Pugsley, 2011). In these conditions, the concentrations decreasing cell viability and density (50% Inhibiting Concentration: IC50) were determined for AZA ST I to VII comparatively to resveratrol and the effects of azo-stilbenes at the mitochondrial level were measured by taking into account the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) per cell after staining with 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)), and the production of reactive oxygen species, mainly superoxide anion, at the mitochondrial level by staining with MitoSOX. The data obtained on N2a cells cultured for 48 h with and without resveratrol, or aza-stilbenes (in a concentration range from 1.5 to 100  $\mu$ M) are presented.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 198 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine

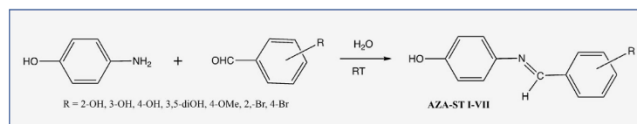
### s0015 7.2 Material and methods

#### s0020 7.2.1 Synthesis of aza-stilbenes I to VII

p0025 The procedure used to synthesize the aza-stilbenes is summarized in [Scheme 7.1](#). Following the Kotora's procedure ([Kotora et al., 2016](#)), an equimolar mixture of 4-aminophenol and aromatic aldehyde in distilled water was stirred at room temperature for 4.5 h. After filtration and drying in the air, the aza-stilbenes were recrystallized from EtOH (II and V), from acetone (I and III), from ethyl acetate (IV), or from acetonitrile (VI and VII). The main chemical characteristics of resveratrol (trans-resveratrol) and AZA-ST I to VII are presented in [Table 7.1](#). In addition, while the resveratrol solution (50 mM, EtOH) is colorless, AZA-ST solutions are most often colored (yellow, orange, brown) with the exception of AZA-ST V, which is slightly whitish ([Fig. 7.2](#)).

#### s0025 7.2.2 Cell culture and treatments

p0030 The mouse neuro-2a (N2a) neuroblastoma cell line (Ref: CCL-131, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Lonza, Amboise, France) containing 10% (v/v) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) (30 min, 56°C) and 1% (v/v) of penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL) (Pan Biotech). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 95% air), trypsinized (0.05% trypsin–0.02% EDTA solution) and passaged twice a week. The cells were seeded at 60,000 cells per well containing 1 mL of DMEM supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated FBS, 1% antibiotics (penicillin, streptomycin), and 10% FBS in 24-well plates (FALCON, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The stock solutions of resveratrol (trans-resveratrol) and aza-stilbenes were prepared as follows: resveratrol was prepared at 50 mM in absolute ethanol (EtOH; Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) and aza-stilbenes (AZA-ST) were prepared at 50 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich). In order to evaluate the effects of aza-stilbenes on N2a cells comparatively to resveratrol, the growth medium was removed after 24 h of culture and the N2a cells were incubated either with resveratrol, or aza-stilbenes used at various concentrations ranging from 1.5 to 100 μM for 48 h.



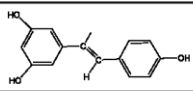
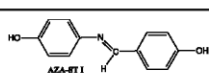
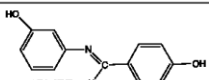
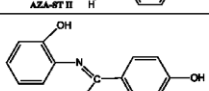
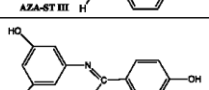
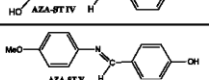
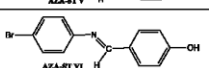
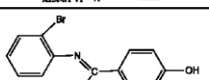
f0040 **SCHEME 7.1**

General procedure of synthesis of aza-stilbenes (AZA-ST) I to VII ([Kotora et al., 2016](#)).

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 7.2 Material and methods 199

Table 7.1 Main chemical characteristics of resveratrol and aza-stilbenes (AZA-ST).

	Molecular formula	Molecular weight (g/mol)	Solubility (50 mM, RT)
Resveratrol			
	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228.24	DMSO
Aza-Stilbenes			
	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	DMSO, absolute ethanol
	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	DMSO
	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	213.228	DMSO
	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	229.228	DMSO, absolute ethanol
	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	227.254	DMSO
	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276.11	DMSO
	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NOBr	276.11	DMSO, absolute ethanol

RT, room temperature.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 200 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine



**FIGURE 7.2**

Aspect of resveratrol (trans RSV: 50 mM) and aza-stilbenes (AZA-ST: 50 mM) diluted in absolute ethanol (EtOH) and DMSO, respectively.

### 7.2.3 Measurement of cell viability with the fluorescein diacetate assay

Cell viability was measured with the FDA (Sigma-Aldrich) assay which takes into account esterase activity (Namsi et al., 2018, 2019). The N2a cells previously cultured for 24 h into 24-well plates in DMEM containing 10% FBS, were further incubated for 48 h with and without resveratrol, or aza-stilbenes used at different concentrations (1.5–100  $\mu$ M). At the end of treatment, cells were incubated in the dark with 15  $\mu$ g/mL FDA for 5 minutes at 37°C, rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS), then lysed with 10 mM Tris–HCl solution containing 1% sodium dodecyl containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 10 minutes. Using a TECAN fluorescence microplate reader (Sunrise spectrophotometer, TECAN, Lyon, France), the fluorescence intensity was measured with an excitation at 485 nm and an emission at 528 nm. All assays were performed in three independent experiments and performed in triplicate. Data were expressed as a percentage of untreated cells (control).

### 7.2.4 Evaluation of adherent cells with crystal violet staining assay

The crystal violet viability test is used to mark living cells that have remained adherent (Vega-Avila & Pugsley, 2011). Cells were seeded in 96-well plates at an initial seeding density of 30,000 cells-cm<sup>-2</sup>, and incubated for 24 h at 37°C, 5%

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 7.2 Material and methods 201

CO<sub>2</sub>. After exposure to resveratrol (1.5–100 μM) and AZA-ST (1.5–100 μM) for 48 h as described previously, the supernatants containing the dead cells are eliminated and the cell layer is rinsed once with PBS. A solution of crystal violet (Sigma Aldrich) is then added on adherent cells for 5 minutes. This dye contains ethanol which will fix the cells and mark them at the level of the nuclei. Three washes are carried out with distilled water to eliminate excess crystal violet. The cells are then dried and incubated in a 0.1 M sodium citrate solution in 50% ethanol. The crystal violet present in the cells is thus dissolved and the absorbance was read at 570 nm (Sassi et al., 2019). Data obtained with crystal violet staining (optical density per well) were expressed as % control (untreated cells).

### s0040 7.2.5 Flow cytometric quantification of cells with depolarized mitochondria with DiOC<sub>6</sub>(3)

p0045 The variation of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was measured using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France). This fluorochrome accumulates in the mitochondria proportionally to the  $\Delta\Psi_m$  value (Ragot et al., 2013); the higher the  $\Delta\Psi_m$ , the more the probe accumulates. After 48 h of treatment, adherent cells collected by trypsinization were pooled with nonadherent cells, and stained with a solution of DiOC<sub>6</sub>(3) at 40 nM (15 min; 37°C). The cells were immediately analyzed on a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The loss of  $\Delta\Psi_m$  is indicated by a decrease in the intensity of the green fluorescence collected through a band pass filter of 520 ± 10 nm. For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with FlowJo (Tree Star Inc., Carrboro, NC, USA) software. All assays were performed in triplicate.

### s0045 7.2.6 Flow cytometric measurement of mitochondrial reactive oxygen species production with MitoSOX-Red

p0050 The MitoSOX-Red is a selective fluorochrome used for the detection of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) at the mitochondrial level (Zarrouk et al., 2012). In the mitochondria, this fluorochrome is oxidized by O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, and exhibits an orange/red fluorescence (λEx = 510 nm; λEm = 580 nm). Mitochondrial production of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> was quantified by flow cytometry after staining with MitoSOX-Red (Thermo Fisher Scientific), initially prepared at 5 mM in PBS (Ghzaïel et al., 2021). Briefly, after 48 h of treatment, adherent and nonadherent N2a cells were pooled, stained with a 5 μM MitoSOX-Red solution and incubated for 15 min at 37°C. At the end of the incubation time, the cells were immediately analyzed by flow cytometry. The fluorescent signals were detected through a 580 ± 20 nm band pass filter using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). For each sample, 10,000 cells were acquired. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc.). All assays were performed in triplicate.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 202 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine

### s0050 7.2.7 Statistical analysis

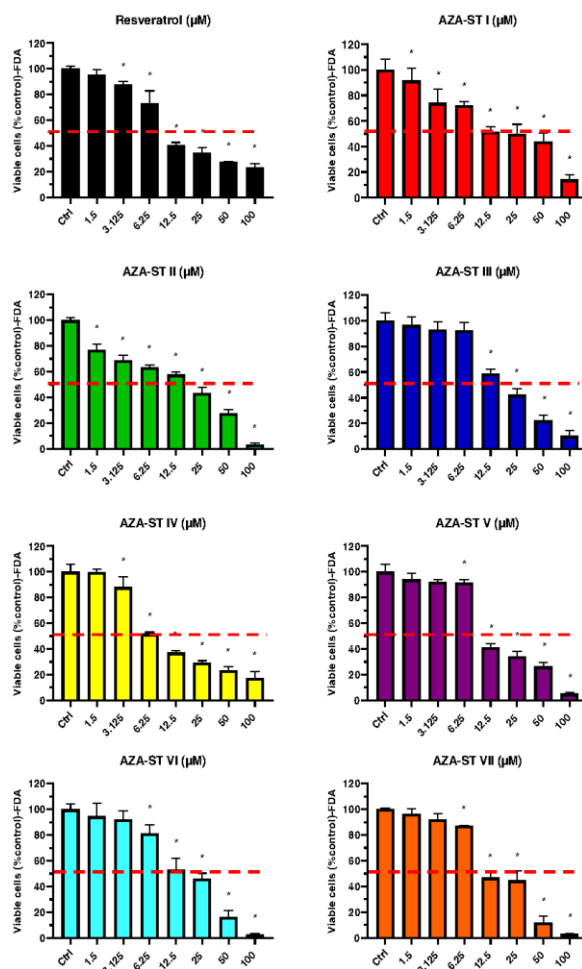
p0055 The experimental results were statistically analyzed with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) and compared with a Student's *t*-test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

### s0055 7.3 Results

p0060 The impact of resveratrol and AZA-ST I to VII on cell viability and cell growth were evaluated by two complementary assays: the FDA assay, which is frequently used to evaluate esterase activity correlated with cell viability (Namsi et al., 2018) and the crystal violet assay, which permits to quantify adherent cells (Namsi et al., 2018). The quantity of adherent cells permits to evaluate cell growth and also cell death since cytotoxic agents induce a loss of cell adhesion. Noteworthy, under treatment with resveratrol and AZA-ST, the decrease of cell viability was associated with a more or less pronounced decrease of FDA positive cells as shown in Fig. 7.3. Based on the IC<sub>50</sub> values determined with the FDA assay, as well as taking into account the effects of concentrations above IC<sub>50</sub> on cell viability, the cytotoxicity of the different molecules studied was in the following range of order: AZA-ST IV (IC<sub>50</sub>  $\sim$  6.25  $\mu$ M) > resveratrol (6.25 < IC<sub>50</sub> < 12.5  $\mu$ M) > AZA-ST VI (IC<sub>50</sub>  $\sim$  12.5  $\mu$ M) > AZA-ST II (IC<sub>50</sub>  $\sim$  12.5  $\mu$ M) > AZA-ST VII (12.5 < IC<sub>50</sub> < 25  $\mu$ M) > AZA-ST V (12.5 < IC<sub>50</sub> < 25  $\mu$ M) > AZA-ST III (12.5 < IC<sub>50</sub> < 25  $\mu$ M) > AZA-ST I (12.5 < IC<sub>50</sub> < 50  $\mu$ M). Noteworthy, with the crystal violet assay (Fig. 7.4), the IC<sub>50</sub> values were in the same range of order than with the FDA assay. This demonstrates that the loss of cell viability under treatment with resveratrol and AZA-ST is associated with a decreased number of adherent cells. As it is well established on different cell types that resveratrol triggers mitochondrial dysfunctions in a concentration dependent manner, the effects of AZA-ST have been studied at the mitochondrial level and compared with those of resveratrol. With the use of DiOC<sub>6</sub>(3), which allows for quantifying the  $\Delta\Psi_m$ , a more or less pronounced loss of  $\Delta\Psi_m$  is observed with the different AZA-ST since 12.5  $\mu$ M (Fig. 7.5). This loss of  $\Delta\Psi_m$  is associated with an overproduction of superoxide anions at the mitochondrial level measured with MitoSOX (Fig. 7.6).

p0065 Altogether, the data obtained show various cytotoxic effects with the different AZA-ST studied. All the AZA-ST studied induce cytotoxic effects in a concentration-dependent manner, characterized by a decrease of esterase activity and a reduced number of adherent cells which are associated with mitochondrial dysfunctions: loss of  $\Delta\Psi_m$  and increased production of superoxide anions at the mitochondrial level.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.



f0020

**FIGURE 7.3**

Evaluation with the fluorescein diacetate (FDA) assay of the effects of resveratrol and AZA-ST I to VII on cell viability. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or AZA-ST I to VII in a range of concentrations from 1.5 to 100 μM. The dotted red line makes it possible to evaluate the value of the concentration (or the range of concentrations) reducing cell viability by 50% (IC50). Data are the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), resveratrol or AZA-ST I to VII—treated cells; Student's *t*-test: \**P* < .05 or less.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

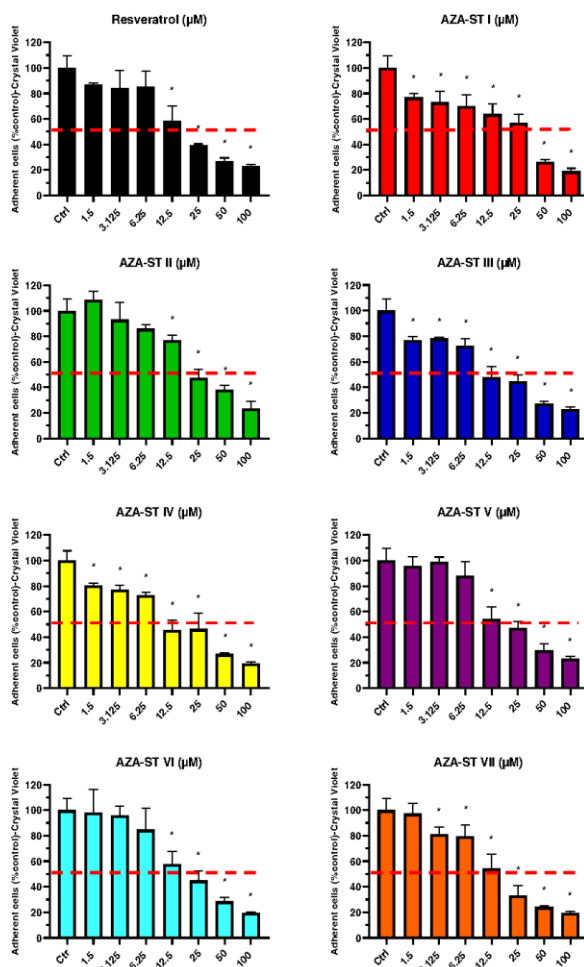


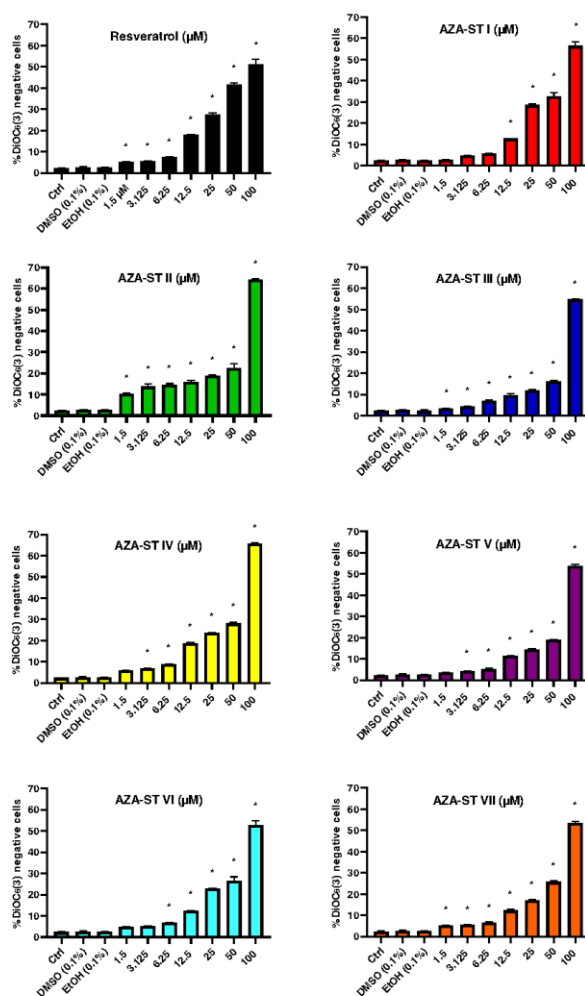
FIGURE 7.4

00025

Evaluation with the crystal violet assay of the effects of resveratrol and AZA-ST I to VII on cell density. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or AZA-ST I to VII in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu$ M. The dotted red line makes it possible to evaluate the value of the concentration (or the range of concentrations) reducing the number of adherent cells by 50% (IC50). Data are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), resveratrol or AZA-ST I to VII—treated cells; Student's *t*-test: \**P* < .05 or less.



To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.



f0030

**FIGURE 7.5**

Flow cytometric evaluation of transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) with DiOC<sub>6</sub>(3) under treatment with resveratrol and AZA-ST I to VII. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or AZA-ST I to VII in a range of concentrations from 1.5 to 100 μM. Data are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), resveratrol or AZA-ST I to VII—treated cells; Student's *t*-test: \**P* < .05 or less.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

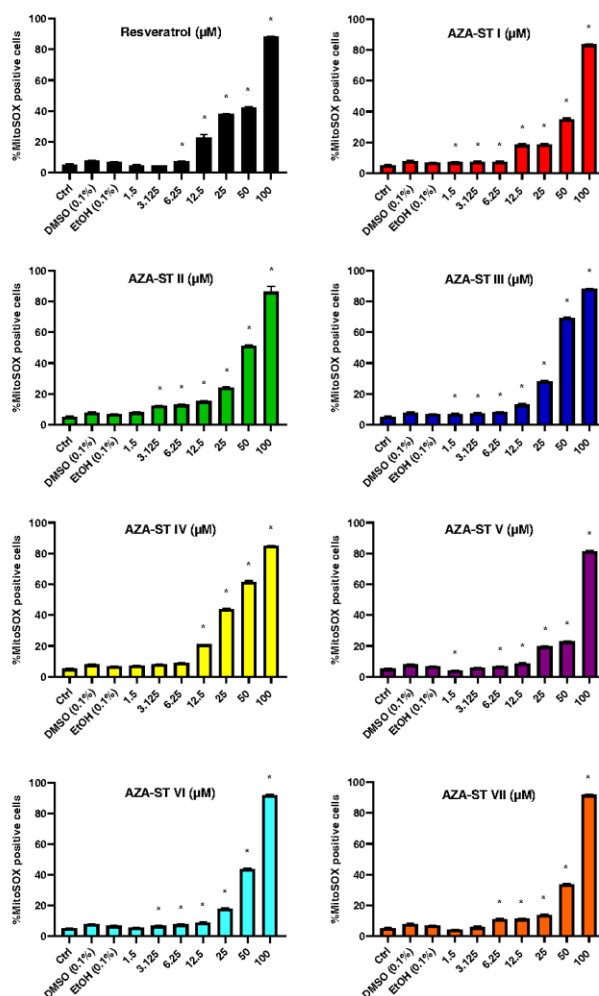


FIGURE 7.6

00035

Flow cytometric evaluation of superoxide anions production at the mitochondrial level with MitoSOX under treatment with resveratrol and AZA-ST I to VII. N2a cells were incubated for 48 h with or without resveratrol or AZA-ST I to VII in a range of concentrations from 1.5 to 100 μM. Data are the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance of the differences between control (untreated cells), resveratrol or AZA-ST I to VII—treated cells; Student's *t*-test: \**P* < .05 or less.

#### s0060 7.4 Discussion and conclusion

p0070 Resveratrol, under its trans configuration, is one of the most studied polyphenols both in vitro and in vivo (Zhang et al., 2021). It is a major compound of the Mediterranean diet with antiaging (Li et al., 2021), antioxidant (Silva et al., 2019), antiinflammatory (Alesci et al., 2022) and antitumoral (Yang et al., 2022) activities. In vivo, the major problem of resveratrol is its rapid catabolism that attenuates its biological activity (Yammine et al., 2021). Resveratrol derivatives, aza-stilbenes (Lizard et al., 2020), have therefore been synthesized with the aim of having a biological activity close to or more efficient than resveratrol with a lower catabolism.

p0075 In terms of toxicity, taking into account cell viability evaluated with esterase activity (FDA assay) and the quantity of adherent cells (crystal violet assay), the results obtained with aza-stilbenes (AZA-ST I to VII) show variable toxicity, either lower or stronger than resveratrol. Thus, with the different AZA-ST which have been synthesized, the IC50 values are in the range of 6.25–25  $\mu$ M.

p0080 Thus, as observed with resveratrol, AZA-ST—induced cell death is associated with a decrease of esterase activity. This decrease, which corresponds to a loss of cell viability, is associated with a lower number of adherent cells. Truly, as previously reported with RSV (Namsi et al., 2018), cell death induction, not only reduces cell growth but also favors cell detachment associated with an increase number of nonadherent cells floating in the culture medium.

p0085 In addition, as observed with RSV, the cytotoxic effects of AZA-ST are associated with marked mitochondrial dysfunctions characterized by a loss of  $\Delta\Psi_m$  occurring since 12.5–25  $\mu$ M and associated with an overproduction of superoxide anions. Therefore, from 12.5  $\mu$ M and higher, it is suggested that AZA-ST could have antitumoral activities, as reported with resveratrol (Vervandier-Fasseur & Latruffe, 2019; Yammine et al., 2021). At lower concentrations, in the range of 1.5–6.25  $\mu$ M, it will be interesting to evaluate the cytoprotective and neurotrophic activities of AZA-ST. Indeed, at low concentrations, some polyphenols (resveratrol, quercetin, apigenin) are known to induce cell differentiation on different cell types (N2a cells which are murine neuronal cells) (Namsi et al., 2018); C2C12 cells which are murine skeletal muscle cells (Kaminski et al., 2012) and also to prevent 7-ketocholesterol-induced cell death by oxiaoptophagy involving OXIdative stress, APOPTosis and autoPHAGY on N2a cells (Nury et al., 2021; Yammine et al., 2020). Altogether, the data obtained support the hypothesis that AZA-ST could act on the cell signaling involved in the control of the RedOx status, mitochondrial activity, and cell death (apoptosis and autophagy). In addition, as immunostimulant activities of polyphenols have been reported on the innate and adaptive immune response in cancer (Ghiringhelli et al., 2012), it will be important to study the effects of AZA-ST in the context of cancer immunotherapy.

p0090 In conclusion, on N2a cells, although the cytotoxic activities of the AZA-ST studied are more or less pronounced depending on the molecule considered, all

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 208 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine

the AZA-ST analyzed induce (as observed with resveratrol) a decrease in esterase activity associated with a decrease in the number of adherent cells and induce significant dysfunctions at the mitochondrial level: loss of  $\Delta\Psi_m$  and overproduction of superoxide anions. These biological activities, which evocate those of resveratrol, encourage us to specify the activities of AZA-ST in vivo and to simultaneously evaluate their catabolism.

### Acknowledgements

s0065

p0095 The authors thank the University de Bourgogne and the University of Tunis El Manar for their administrative assistance (collaboration France—Tunisia) and their financial support. This work was also supported by the Regional Council of Bourgogne Franche-Comté (MEDICTA Research Project; Dominique Vervandier-Fasseur, Anne Vejux, and Gérard Lizard) and is also a part of a Hubert Curien project (PHC Utique 2021–2022; Code CMCU: 22G0809/Code Campus France: 47608VJ; title: potentiels neurotrophiques d'huiles essentielles, de stibènes et oxystérols sur des modèles cellulaires de neurodégénérescence; University of Bourgogne and University of Tunis El Manar; Taoufik Ghrairi/Oiifa Masmoudi-Kouki and Gérard Lizard).

### Conflict of interest

s0070

p0100 The authors declare no conflict of interest.

### References

- Alesci, A., Nicosia, N., Fumia, A., Giorgianni, F., Santini, A., & Cicero, N. (2022). Resveratrol and immune cells: A link to improve human health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*.
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Baini, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, *10*.
- Biscussi, B., Richmond, V., Baier, C. J., Mañez, P. A., & Murray, A. P. (2020). Design and microwave-assisted synthesis of aza-resveratrol analogs with potent cholinesterase inhibition. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *19*, 630–641.
- Dugas, B., Charbonnier, S., Baarine, M., Ragot, K., Delmas, D., Ménétrier, F., Lherminier, J., Malvitte, L., Khalfaoui, T., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Latruffe, N., & Lizard, G. (2010). Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: Cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *European Journal of Nutrition*, *49*, 435–446.
- Fransen, M., Revenco, I., Li, H., Costa, C. F., Lismont, C., & Van Veldhoven, P. P. (2020). Peroxisomal dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative disease: A bidirectional crosstalk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1299*, 19–30.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## References 209

- Fukutomi, R., Ohishi, T., Koyama, Y., Pervin, M., Nakamura, Y., & Isemura, M. (2021). Beneficial effects of epigallocatechin-3-O-gallate, chlorogenic acid, resveratrol, and curcumin on neurodegenerative diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*.
- Ghiringhelli, F., Rebe, C., Hichami, A., & Delmas, D. (2012). Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *12*, 852–873.
- Ghzaïel, I., Zarrouk, A., Nury, T., Libergoli, M., Florio, F., Hammouda, S., Ménétrier, F., Avoscan, L., Yammine, A., Samadi, M., Latruffe, N., Biressi, S., Levy, D., Bydlowski, S. P., Hammami, S., Vejux, A., Hammami, M., & Lizard, G. (2021). Antioxidant properties and cytoprotective effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil against 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-induced toxicity in C2C12 myoblasts: Reduction in oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions and attenuation of cell death. *Antioxidants (Basel)*, *10*.
- Giacobini, E., Cuello, A. C., & Fisher, A. (2022). Reimagining cholinergic therapy for Alzheimer's disease. *Brain*.
- Jakaria, M., Belaidi, A. A., Bush, A. I., & Ayton, S. (2021). Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *159*, 804–825.
- Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2015). Alzheimer's disease, *Drosophila* melanogaster and polyphenols. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *863*, 21–53.
- Kagechika, H., Kawachi, E., Hashimoto, Y., & Shudo, K. (1985). Differentiation inducers of human promyelocytic leukemia cells HL-60. Azobenzenecarboxylic acids and stilbenecarboxylic acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, *33*, 5597–5600.
- Kaminski, J., Lançon, A., Aires, V., Limagne, E., Tili, E., Michaille, J. J., & Latruffe, N. (2012). Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochemical Pharmacology*, *84*, 1251–1259.
- Kotora, P., Šeršeň, F., Filo, J., Loos, D., Gregáň, J., & Gregáň, F. (2016). The scavenging of DPPH, galvinoxyl and ABTS radicals by imine analogs of resveratrol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*, E127.
- Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., & Guan, F. (2021). Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, *22*, 165–187.
- Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P., & Franssen, M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*, 35.
- Lizard, G., Latruffe, N., & Vervandier-Fasseur, D. (2020). Aza- and azo-stilbenes: Bioisosteric analogs of resveratrol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*.
- Namsi, A., Nury, T., Hamdouni, H., Yammine, A., Vejux, A., Vervandier-Fasseur, D., Latruffe, N., Masmoudi-Kouki, O., & Lizard, G. (2018). Induction of neuronal differentiation of murine N2a cells by two polyphenols present in the mediterranean diet mimicking neurotrophins activities: Resveratrol and apigenin. *Diseases*, *6*.
- Namsi, A., Nury, T., Khan, A. S., Leprince, J., Vaudry, D., Caccia, C., Leoni, V., Atanasov, A. G., Toton, M. C., Masmoudi-Kouki, O., & Lizard, G. (2019). Octadecanuropeptide (ODN) induces N2a cells differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-dependent pathway: Incidence on peroxisome, mitochondria, and lipid profiles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*.
- Nury, T., Zarrouk, A., Yammine, A., Mackrill, J. J., Vejux, A., & Lizard, G. (2021). Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *British Journal of Pharmacology*, *178*, 3115–3123.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## 210 CHAPTER 7 Analysis of the mitochondrial status of murine

- Ragot, K., Mackrill, J. J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., Pais de Barros, J. P., Véjux, A., Riedinger, J. M., Delmas, D., & Lizard, G. (2013). Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochemical Pharmacology*, *86*, 67–79.
- Rana, M., Cho, H. J., Roy, T. K., Mirica, L. M., & Sharma, A. K. (2018). Azo-dyes based small bifunctional molecules for metal chelation and controlling amyloid formation. *Inorganica Chimica Acta*, *471*, 419–429.
- Rodrigo, R., & Bosco, C. (2006). Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *142*, 317–327.
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *412*, 410–424.
- Sassi, K., Nury, T., Zarrouk, A., Sghaier, R., Khalafi-Nezhad, A., Vejux, A., Samadi, M., Aissa-Fennira, F. B., & Lizard, G. (2019). Induction of a non-apoptotic mode of cell death associated with autophagic characteristics with steroidal maleic anhydrides and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol on glioma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *191*, 105371.
- Siddiqui, A., Dandawate, P., Rub, R., Padhye, S., Aphale, S., Moghe, A., Jagyasi, A., Venkateswara Swamy, K., Singh, B., Chatterjee, A., Ronghe, A., & Bhat, H. K. (2013). Novel Aza-resveratrol analogs: Synthesis, characterization and anticancer activity against breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *23*, 635–640.
- Silva, P., Sureda, A., Tur, J. A., Andreoletti, P., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2019). How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean diet, towards alterations during the aging process? *Free Radical Research*, *53*, 1101–1112.
- Uddin, M. S., Al Mamun, A., Kabir, M. T., Ahmad, J., Jeandet, P., Sarwar, M. S., Ashraf, G. M., & Aleya, L. (2020). Neuroprotective role of polyphenols against oxidative stress-mediated neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology*, *886*, 173412.
- Uddin, M. S., Mamun, A. A., Rahman, M. M., Jeandet, P., Alexiou, A., Behl, T., Sarwar, M. S., Sobarzo-Sánchez, E., Ashraf, G. M., Sayed, A. A., Albadrani, G. M., Peluso, I., & Abdel-Daim, M. M. (2021). Natural products for neurodegeneration: Regulating neurotrophic signals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, 8820406.
- Vega-Avila, E., & Pugsley, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, *54*, 10–14.
- Vervandier-Fasseur, D., & Latruffe, N. (2019). The potential use of resveratrol for cancer prevention. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*.
- Yamine, A., Namsi, A., Vervandier-Fasseur, D., Mackrill, J. J., Lizard, G., & Latruffe, N. (2021). Polyphenols of the Mediterranean diet and their metabolites in the prevention of colorectal cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*.
- Yamine, A., Zarrouk, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Mackrill, J. J., Greige-Gerges, H., Auezova, L., & Lizard, G. (2020). Prevention by dietary polyphenols (resveratrol, quercetin, apigenin) against 7-Ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in neuronal N2a cells: Potential interest for the treatment of neurodegenerative and age-related diseases. *Cells*, *9*.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## References 211

- Yang, R., Dong, H., Jia, S., & Yang, Z. (2022). Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H. I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J. M., Hammami, M., & Lizard, G. (2012). Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 623257.
- Zhang, L. X., Li, C. X., Kakar, M. U., Khan, M. S., Wu, P. F., Amir, R. M., Dai, D. F., Naveed, M., Li, Q. Y., Saeed, M., Shen, J. Q., Rajput, S. A., & Li, J. H. (2021). Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 143, 112164.

To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.



To protect the rights of the author(s) and publisher we inform you that this PDF is an uncorrected proof for internal business use only by the author(s), editor(s), reviewer(s), Elsevier and typesetter MPS. It is not allowed to publish this proof online or in print. This proof copy is the copyright property of the publisher and is confidential until formal publication.

## NON-PRINT ITEM

### Abstract

Polyphenols are natural antioxidant molecules. They are present in several compounds, mainly fruits and vegetable, of the Mediterranean diet and have benefits on human health. Several studies support that they delay the aging process and prevent age-related diseases. However, as polyphenols are rapidly metabolized, their *in vivo* efficiency can be limited. Having more effective polyphenols *in vivo* is therefore a major challenge. In this context, aza-stilbenes deriving from resveratrol (trans-resveratrol) have been synthesized. In a first step, the cytotoxic activities of these molecules (AZA-ST I to VII) were compared with those of resveratrol (trans-resveratrol) in a range of concentrations from 1.5 to 100  $\mu\text{M}$  after 48 h of culture on murine neuronal N2a cells with complementary micro-methods: fluorescein diacetate assay, which evaluates cell viability, and crystal violet assay, which permits the measure of density of adherent cells. In a second step, the impact of these molecules at the mitochondrial level were determined: the transmembrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) was measured by flow cytometry after staining with DiOC<sub>6</sub>(3) and the mitochondrial production of superoxide anions was quantified by flow cytometry after staining with MitoSOX. Altogether, comparatively to resveratrol, our data show different levels of cytotoxicity of AZA ST I to VII with 50% inhibiting concentrations (IC<sub>50</sub>) values in the range of 6.25–25  $\mu\text{M}$ . In addition, as observed with resveratrol, these cytotoxic effects were associated with a dose-dependent loss of  $\Delta\Psi\text{m}$  and an overproduction of superoxide anions at the mitochondrial level. In conclusion, the aza-stilbenes I to VII have varying toxicities. Like resveratrol, when they are used at high concentrations, they induce mitochondrial dysfunctions.

**Keywords:** Polyphenol; resveratrol; stilbene; Aza-stilbene; mitochondria; N2a cells

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

**Therapeutic applications of oxysterols and derivatives in age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, and cancer**

Mohamed Ksila <sup>1,2</sup>, Imen Ghzaïel <sup>1,3</sup>, Khoulood Sassi <sup>1</sup>, Amira Zarrouk <sup>3,4</sup>, Valerio Leoni <sup>5</sup>, Giuseppe Poli <sup>6</sup>, Leila Rezig <sup>7</sup>, Vivien Pires <sup>1</sup>, Smail Meziane <sup>8</sup>, Atanas G. Atanasov <sup>9</sup>, Sonia Hammami <sup>3,10</sup>, Mohamed Hammami <sup>3</sup>, Olfa Masmoudi-Kouki <sup>2</sup>, Oumaima Hamdi <sup>10,11</sup>, Pierre Jouanny <sup>11</sup>, Mohammad Samadi <sup>12</sup>, Anne Vejux <sup>1</sup>, Taoufik Ghraïri <sup>2</sup>, Gérard Lizard <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA 7270 / University of Bourgogne / Inserm, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Laboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology and Valorisation of Biomolecules, (LR18ES03), Department of Biology, Faculty of Sciences, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, Laboratory 'Nutrition, Functional Food and Vascular Health', (LR12ES05), University of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, University of Sousse, Laboratory of Biochemistry, 4011 Sousse, Tunisia

<sup>5</sup> Department of Laboratory Medicine, University of Milano-Bicocca, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Brianza ASST-Brianza, Desio Hospital, Via Mazzini 1, 20833 Desio, Italy

<sup>6</sup> Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, San Luigi Hospital, Orbassano, 10043 Turin, Italy

<sup>7</sup> University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, LR11ES26, LIP-MB 'Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules', Tunis 1080, Tunisia; University of Carthage, High Institute of Food Industries, 58 Alain Savary Street, El Khadra City, 1003 Tunis, Tunisia

<sup>8</sup> Institut Européen des Antioxydants (IEA), 1B, rue Victor de Lespinats, 54230 Neuves-Maisons, France

<sup>9</sup> Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, 05-552 Magdalenka, Poland

<sup>10</sup> University Hospital Fattouma Bourguiba, 5000 Monastir, Tunisia

<sup>11</sup> Pôle Personnes Agées, CHU de Dijon, Centre de Champmaillot, 21079 Dijon Cedex, France

<sup>12</sup> Laboratory of Chemistry and Physics Multi-Scale Approach to Complex Environments, Department of Chemistry, University Lorraine, 57070 Metz, France

**Corresponding author** : Dr Gérard Lizard, laboratoire Bio-PeroXIL / EA7270, Faculté des Sciences Gabriel, 6, Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France ; E.mail : [gerard.lizard@u-bourgogne.fr](mailto:gerard.lizard@u-bourgogne.fr); Phone : +33 3 80 39 62 56 ; Fax : + 33 3 80 39 62 50

**Abstract**

Oxysterols, resulting from the oxidation of cholesterol, are formed either by autoxidation, enzymatically, or by both processes. These molecules, which are provided in more or less important quantities depending on the type of diet, are also formed in the body and their presence is associated with a normal physiological activity. Their increase and decrease at the cellular level and in biological fluids can have significant consequences on health due or not to the interaction of some of these molecules with different types of receptors but also because oxysterols are involved in the regulation of RedOx balance, cytokinic and non-cytokinic inflammation, lipid metabolism and induction of cell death. Currently, various pathologies such as age-related diseases, inflammatory and infectious diseases and several cancers are associated with abnormal levels of oxysterols. Due to the important biological activities of oxysterols, their interaction with several receptors and their very likely implications in several diseases, this review focuses on these molecules and on oxysterol derivatives, that are often more efficient, in a therapeutic context. Currently, several oxysterol derivatives are developed and are attracting a lot of interest.

**Keywords**

Oxysterols, therapeutic applications, age-related diseases, Alzheimer's disease, cardiovascular diseases, eye diseases, osteoporosis, infectious diseases, inflammatory diseases, cancer.

**Abbreviations**

AMD: age-related macular degeneration; ChEH: cholesterol epoxide hydrolase; LXRs: liver X receptors  $\alpha$  or  $\beta$ ; CT: cholestane-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol; 4 $\beta$ -OHC: 4 $\beta$ -hydroxycholesterol; 7KC: 7-ketocholesterol; 7 $\beta$ -OHC: 7 $\alpha$ -OHC: 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 7 $\beta$ -hydroxycholesterol; 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC: 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol; 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC: 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol; 20S-OHC: 20(S)-hydroxycholesterol; 22R-OHC: 22(R)-hydroxycholesterol; 22S-OHC: 22(S)-hydroxycholesterol; 24S-OHC: 24(S)-hydroxycholesterol; 25-OHC: 25-hydroxycholesterol or 5-Cholestene-3 $\beta$ ,25-diol; 7 $\alpha$ ,25-DHC: 7 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol; CH25H: cholesterol 25-hydroxylase; 27-OHC: 27-hydroxycholesterol

### 1. Oxysterols: from key players in various diseases to therapeutic applications

Oxysterols are derived from the oxidation of cholesterol (also named: cholesterin, cholesteryl alcohol, and cholest-5-en-3beta-ol; PubChem CID 5997) (Figure 1). Oxysterols formed by autoxidation and / or enzymatically are identified at variable levels in all cells of the body as well as in biological fluids, and are associated with normal physiological activity (Mutemberezi et al., 2016). From one cell type to another, depending on the tissue and the organ considered, the oxysterol profile can be different, and it can vary under the influence of intrinsic factors (genetic factors, metabolism) and extrinsic factors (lifestyle, physical and emotional stress, diet) (Dias et al., 2019). Oxysterol levels, depending on the diseases concerned and their stages, can be either decreased or increased, highly or slightly. In addition, oxysterols are involved in the regulation of RedOx balance, cytokinic and non-cytokinic inflammation, lipid metabolism and the activation of cell death which are hallmarks of aging and of age-related diseases (de Freitas et al., 2021) (de Medina et al., 2022). Some of them, especially those oxidized on the side chain, also interact with specific receptors such as: (a) nuclear receptors (liver X receptors (LXRs)  $\alpha$  or  $\beta$  (Viennois et al., 2011); retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  (ROR $\alpha$  [NR1F1] and ROR $\gamma$  [NR1F3]) (Wang et al., 2010); (b) cytoplasmic receptors such as SREBP (sterol regulatory element binding transcription protein) (Sato, 2010), NPC1 (NPC intracellular cholesterol transporter 1 / Nieman-Pick type C1) (Yu et al., 2014), FXR (NR1H4, farnesoid X receptor alpha) (Kovač et al., 2019), oxysterols binding proteins (OSBPs), OSBPs-related proteins (ORPs) (Olkonen and Ikonen, 2022) (Arora et al., 2022) and cholesterol epoxide hydrolase (ChEH) (also named anti-estrogen binding site (AEBS) which is a hetero-oligomeric complex comprising 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\delta$ (8)- $\delta$ (7)-isomerase (D8D7I) and 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\delta$ (7)-reductase (DHCR7)) (Silvente-Poirot and Poirot, 2012), and (c) the Epstein–Barr virus-induced gene 2 receptor (EBI2, also known as GPR183) (Hannedouche et al., 2011) (Liu et al., 2011) (Emgård et al., 2018). Some of these receptors are involved in cholesterol trafficking, cell proliferation, and cell death. There are also several lines of evidence that RORs, FXR, LXRs, and EBI2 are involved in inflammation (Spann and Glass, 2013) (Pascual-García and Valledor, 2012) (Fessler, 2018) (Cariello et al., 2021). 7-ketocholesterol (7KC) and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OHC), either minimally or do not interact with these receptors. However, 7KC could interact with tyrosine kinases receptors (Kim and Lee, 2010). Due to the important biological activities of oxysterols, their interaction with several receptors and their very likely

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

implications in several diseases especially age-related diseases (cardiovascular and eye diseases, neurodegenerative diseases, osteoporosis) (Zarrouk et al., 2014), infectious and inflammatory diseases, such as COVID-19 (Marcello et al., 2020) and inflammatory bowel disease (Offei et al., 2019), as well as some cancer, especially breast cancer (Decker et al., 2023) and prostate cancer (Celhay et al., 2019), this has led to study these molecules in a pharmacological context and to develop oxysterol derivatives for therapeutic applications (Brown et al., 2021). In addition, oxysterol levels may be employed as biomarkers for the diagnosis of specific diseases or in predicting the incidence rate of diseases such as age-related diseases, infectious and inflammatory diseases and cancer (Samadi et al., 2021).

## **2. Pharmacological interest of oxysterols and derivatives in age-related diseases**

### ***2.1-Eye diseases***

Cataract and age-related macular degeneration (AMD) are the most frequent age-related eye diseases. In these diseases, the involvement of oxysterols is highly likely (Vejud et al., 2011) (Zhang et al., 2021).

#### ***2.1.1-Cataract***

Cataracts can begin to develop as early as the age of 50 and symptoms can occur from 60 to 70 years of age. In cataract, characterized by a progressive opacity of the crystallin, the contribution of oxysterols especially those formed by autoxidation, such as 7KC, is widely suspected (Girão et al., 1998) (Vejud et al., 2011) (Reyes et al., 2023). At the moment, an efficient surgical treatment is available. However, due to its cost, this treatment is not necessarily accessible to all patients. Consequently, the identification of drugs allowing a non surgical treatment, which would be less expensive, is an important challenge (Lian and Afshari, 2020) (Lu et al., 2022). In addition, an alternative to surgical correction may be not only applied to adult patients without access to surgical care but also to infantile cataracts which cannot be cured by surgical treatment (Skinner and Miraldi Utz, 2017) (Xu et al., 2020). At the moment, lanosterol and 25-hydroxycholesterol (25-OHC / 5-cholesten-3 $\beta$ ,25-diol also named VP1-001) have been reported to combat the aggregation of proteins in the crystallin both in vivo and ex vivo (Zhao et al., 2015) (Chen et al., 2018) (Wang et al., 2022b) (Lee and Afshari, 2023) (**Figure 1**). The ability of 25-OHC / VP1-001 to bind  $\alpha\beta$ -crystallin, a chaperone maintaining protein stability and preserving lens transparency (Horwitz, 1992) (Rajagopal et al., 2015), seems important to reverse lens opacity in mouse models of cataract (Molnar et al., 2019). The efficiency of lanosterol and 25-OHC / VP1-001 is however

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

controversed: both sterol would fail to reach an acceptable threshold binding scores for good predictive binding to the  $\alpha$ B-crystallin (Daszynski et al., 2019).

### **2.1.2-Age-related macular degeneration**

Age-related macular degeneration (AMD) concerns people over the age of 50. In AMD which affects the retina and results in a loss of central vision, two forms exist: the dry form (the most common), and the exudative form, which is rare and results from the evolution of the dry form to an advanced stage (<https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/age-related-macular-degeneration>, consulted on 20 February, 2023).

AMD is characterized by the presence of high 7KC levels in lipid deposits called drusens which are localized between the Bruch membrane and the basement membrane of retinal pigment epithelial cells (Malvitte et al., 2006) (Rodríguez and Larrayoz, 2010) (Rodríguez et al., 2014). Due to the pro-oxidant, pro-inflammatory, pro-angiogenic activities of 7KC and to its capacity to trigger cell death (Vejux and Lizard, 2009) (Amaral et al., 2013), this oxysterol could contribute to favor retinal damages including retinal neovessels formation. Analysis of post-mortem eyes of patients with AMD showed that retinal pigment epithelial cells die by apoptosis (Dunaief et al., 2002) and investigations conducted with 7KC and 7 $\beta$ -OHC on human retinal cell lines (R28, ARPE-19) (Ong et al., 2003) (Rodríguez et al., 2004) and on primary cell cultures (neuroretina cells, primary porcine retinal pigment epithelial cells) (Chang and Liu, 1998) (Joffre et al., 2007) described cytotoxic and pro-inflammatory effects with 7KC and 7 $\beta$ -OHC. The cytotoxic effect of 7 $\beta$ -OHC was also studied on human pigment retinal epithelial cells (ARPE-19) (Malvitte et al., 2008). It was shown that 7KC can be converted in 7 $\beta$ -OHC by the enzyme hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD1) expressed in retinal pigment epithelium and choroid (Zola et al., 2022) (Ghzaïel, 2022). On ARPE19 cells, 7 $\beta$ -OH induces a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization (Malvitte et al., 2008). At the moment, the cytotoxic effects of 7KC have been extensively studied to clarify its role in the pathophysiology of AMD in order to identify pharmacological targets and new treatment strategies (Pariante et al., 2019). In the context of AMD, but also of cataract, new therapeutic approaches based on the degradation of 7KC or its inactivation are promising avenues (Ghosh and Khare, 2017) (Ghzaïel, 2022).

It is important to emphasize that oxysterols oxidized on the lateral chain are also present at the retinal level. These oxysterols formed enzymatically from cholesterol via the enzyme CYP-46A1 to give 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) and via the enzyme CYP-27A1 to give 27-hydroxycholesterol (27-OHC), are present in cone and rod cells as well as in

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

nerve cells such as Müller cells (Léger-Charnay et al., 2019) (Zhang et al., 2021). These oxysterols depending on their concentrations may also influence the activity of retinal cells. So, in AMD, decrease and/or increase expression and/or activity of CYP46-A1 and CYP27-A1 may be involved. In agreement with this hypothesis, mice deficient in CYP46-A1 and/or CYP27-A1 in the retina have disturbed electroretinograms indicating a decreased of the vision (Petrov et al., 2019).

### **2.2-Alzheimer's disease**

In France, Alzheimer's disease affects 3% of the age group over 65 years and more than 20% of the population over 80 years. Currently, in Alzheimer's disease the amyloid theory is the best known and the most studied (Paroni et al., 2019) (Ma et al., 2022). The latter has more or less put other fields of research in second place such as the involvement of lipid metabolism (fatty acids, cholesterol) as well as the involvement of oxysterols in this frequent and highly disabling neurodegenerative disease with significant social and economic consequences (Björkhem et al., 2006) (Kenigsberg et al., 2009). These two approaches, amyloid and lipid theory of Alzheimer's disease, are not as distinct: indeed, amyloids can have consequences on lipid metabolism, and the latter can interact with amyloidogenesis (Sjögren et al., 2006) (Zarrouk et al., 2018). For several years, it is important to underline that the involvement of cholesterol and its precursors as well as of some of its oxidized derivatives (oxysterols) has been widely suspected (Vaya and Schipper, 2007).

In Alzheimer's disease a prominent role is mainly attributed to 24S-OH, initially named cerebrosterol (Di Frisco et al., 1953). Indeed, when 24S-OHC is quantified in cerebrospinal fluid and plasma, its quantity makes possible to assess brain status (brain mass, neuronal metabolism) (Leoni and Caccia, 2011). At the beginning of the disease, the destruction of neurons can lead to an increase in 24S-OHC, while in advanced stages, when brain mass is decreased, the amount of 24S-OHC is decreased. In humans and mouse models, CYP46A1 activity is altered. Currently, in addition to 24S-OHC, 27-OHC formed from cholesterol by the enzyme CYP-27A1 also appears to be involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease (Wang et al., 2016). Indeed, 27-OHC can cross the blood brain barrier which is altered in Alzheimer's disease (Björkhem, 2006), and there is evidence indicating its influence in the progression of the disease (Loera-Valencia et al., 2019). Interestingly, synthetic oxysterols inducing the production of the LXR agonists 24S-OHC by upregulating *CYP46A1*, encoding the enzyme converting cholesterol into 24S-OHC, were also described (Zhan et al., 2023).

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

Whereas 24S-OHC and 27-OHC are potentially most closely involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, the possible involvement of oxysterols resulting from cholesterol autoxidation, including 7KC and 7 $\beta$ -OHC, is now emerging (Testa et al., 2016) (Zarrouk et al., 2020). In a systematic analysis of oxysterols in post-mortem human Alzheimer's disease brains, classified by the Braak staging system of neurofibrillary pathology, several oxysterols deriving from cholesterol autoxidation were identified; 7KC, 7 $\beta$ -OHC, 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OHC), 4 $\beta$ -hydroxycholesterol (4 $\beta$ -OHC), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC), and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol (5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC) (Testa et al., 2016).

By initiating cholesterol efflux and activating the cholesterol synthesis pathway, CYP46A1 is the key enzyme that ensures brain cholesterol turnover (Pikuleva and Cartier, 2021) and constitutes a new therapeutic target in Alzheimer's disease (Djelti et al., 2015).

### 2.3-Osteoporosis

The effects of oxysterols on osteogenesis have been reported since 2004 by Kha et al in the murine multipotent bone marrow stromal M2-B104 cells which differentiate in osteoblasts and adipocytes (Kha et al., 2004).

On M2-B104 cells, pro-osteogenic effects have been observed with (22(R)-hydroxycholesterol (22R-OHC), 22(S)-hydroxycholesterol (22S-OHC) and 20(S)-hydroxycholesterol (20S-OHC), while anti-osteogenic effects have been found with 7KC (Kha et al., 2004) as well as with cholestane-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol (CT) on rat bone marrow stromal cells (Liu et al., 2005) (**Figure 2**). 22R-OHC and 22S-OHC, which are LXR agonist and antagonist, respectively (Janowski et al., 1996), are osteogenic inducers, whereas they have opposing effects on ROS production (Shouhed et al., 2005). On M2-10B4 and C3H10T1/2, osteogenesis induced by 20S-OHC and 22S-OHC involves protein kinase A (PKA) - and protein kinase C (PKC)-associated signaling pathways (Richardson et al., 2007) as well as the Hedgehog pathway (Dwyer et al., 2007) (Kim et al., 2007) (Amantea et al., 2008). The combination of 22S-OHC and 20S-OHC also promotes periodontal regeneration using periodontal ligament stem cells and alveolar bone healing models (Lee et al., 2017) (Che et al., 2022). It has also been shown that 27-OHC, which can be found at high level in the plasma of post-menopausal women and interacts with the estrogen receptor (Nelson et al., 2014) (He and Nelson, 2017), could also promote osteoporosis (Chang et al., 2019). 25-OHC formed from cholesterol by the enzyme CH25H also inhibits differentiation into osteoblasts (Moseti et al., 2020). This oxysterol triggers oxiaoptophagy (Nury et al., 2021) in human osteoblast-like MG-63 cells and in the femoral bone of a mouse model of osteoporosis



Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

obtained by ovariectomy (Seo et al., 2023). Consequently, there are several proofs in favor of an involvement of oxysterols formed either by autoxidation (7KC) and enzymatically (22R-OHC, 22S-OHC, 20S-OHC, 27-OHC) or both (25-OHC) in osteoporosis.

At the moment, several oxysterol derivatives of 20S-OHC have been synthesized to identify molecules more suitable for clinical applications. Two structural derivatives of 20S-OHC, Oxy34 and Oxy49 (**Figure 3**), were identified inducing osteogenic differentiation and inhibiting the adipogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells (M2-10B4) through activation of Hedgehog signaling (Johnson et al., 2011). Oxy49 also induces osteogenic differentiation on rabbit bone marrow stromal cells (Hokugo et al., 2013). Despite the great promise of Oxy34 and Oxy49, it was important to obtain molecules as efficient with a significantly lower production cost. According to these criteria, Oxy133 (**Figure 3**) which induces significant expression of osteogenic markers Runx2, osterix, alkaline phosphatase, bone sialoprotein, and osteocalcin in C3H10T1/2 mouse embryonic fibroblasts and in M2-10B4 cells, was obtained (Montgomery et al., 2014).

### **3. Oxysterols and derivatives in the pathophysiology and treatment of infectious diseases**

Some oxysterol such as 25-OHC and its metabolite  $7\alpha,25$ -dihydroxycholesterol ( $7\alpha,25$  DHC) synthesized from 25-hydroxycholesterol by cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1 (CYP7B1) enzyme as well as 27-OHC have emerged as important lipid mediators in the response to both bacterial and viral infections mostly through the modulation of the immune response (Bah et al., 2017) (Foo et al., 2022); however, these oxysterols can also reduce viral entry in the cells, reduce viral replication, assembly and release (Foo et al., 2022); CH25H may inhibit SARS-CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol and blocking membrane fusion (Wang et al., 2020) (Zang et al., 2020). 25-OHC is also described as a potent SARS-CoV-2 inhibitor (Zu et al., 2020). In addition, there are lot of evidences that 25-OHC and  $7\alpha,25$ -DHC have wide-ranging influences on innate and adaptive immunity (Cyster et al., 2014). Oxysterols bearing an additional ketone or hydroxyl group in the sterol ring, namely in the B ring, such as 7KC,  $7\alpha$ -OHC, and  $7\beta$ -OHC, also have some antiviral activities (Lembo et al., 2016). In patients with severe forms of COVID-19, physiological serum levels of 27-OHC were significantly decreased compared to the matched control group whereas 7KC and  $7\beta$ -OHC levels were significantly increase (Marcello et al., 2020) leading to suggest that 7KC might be involved in the pathophysiology of COVID-19 by contributing

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

to the acute respiratory distress syndrome via its pro-oxidant and pro-inflammatory activities (Ghzaïel et al., 2021). In addition, 7KC, 22R-OHC, 24S-OHC, and 27-OHC, substantially inhibited SARS-CoV-2 propagation in cultured cells, and the oxysterol derivatives Oxy210 and Oxy232 (**Figure 3**) reduce viral replication more than 90% at 10  $\mu$ M and 99% at 15  $\mu$ M, respectively (Ohashi et al., 2021).

#### **4. Oxysterols and derivatives in inflammatory diseases and immunotherapy**

There are lot of evidence supporting the involvement of oxysterols in frequent inflammatory human diseases such as atherosclerosis, inflammatory Bowel disease and arthritis (Testa et al., 2018). 7KC and 7 $\beta$ -OHC which are found at increased level in the plasma and atherosclerotic plaques of patients with cardiovascular diseases are strongly pro-inflammatory oxysterols (Veïux and Lizard, 2009). Several adverse activities (including stimulation of oxidative stress and induction of inflammatory processes) of 7KC, 7 $\beta$ -OHC, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC, and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC often present at elevated concentration in processed and/or stored cholesterol-rich foods are suspected in inflammatory Bowel disease (Biasi et al., 2009). Slight but significant increases of 7KC and CT were also observed in silicosis (Aksu et al., 2020). In addition, critical roles of 25-OHC (formed from cholesterol by the enzyme cholesterol 25-hydroxylase (CH25H)) and its metabolite 7 $\alpha$ ,25 DHC, which interacts with EBI2, also known as GPR183, are suspected in inflammatory Bowel disease. Thus, 25-OHC limits intestinal IgA plasma cell differentiation (Trindade et al., 2021), and 7 $\alpha$ ,25 DHC promotes colonic inflammation in mice (Emgård et al., 2018). CH25H may contribute to intestinal fibrosis which is a common complication of Crohn's disease (Raselli et al., 2019). 25-OHC could also be involved in osteoarthritis; this oxysterol induces apoptosis on chondrocytes and caspase-dependent apoptosis as well as proteoglycan loss in the articular cartilage of cultured rat knee joints (Seo et al., 2020). Noteworthy, Oxy210 (**Figure 3**) has marked anti-inflammatory activities in human and mouse macrophages, THP-1 and RAW264.7, respectively, via Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) 4 and TLR2 signaling (Wang et al., 2022a).

#### **5. Oxysterols and derivatives in cancer: focus on new therapeutic tools and concept of metabolic therapy**

Lipid metabolism is an important criterion to take into account in carcinogenesis because it affects cell proliferation and differentiation, oxidative stress, inflammation, and multidrug

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

resistance which are all parameters involved in the control of cell death (Huang and Freter, 2015). It is currently well established that some oxysterols interacting or not with receptors are involved in carcinogenesis because of their mutagenic and carcinogenic properties, their effects on cell differentiation, and their pro-oxidant and inflammatory properties (Jusakul et al., 2011) (de Freitas et al., 2021). However, the contribution of oxysterols in carcinogenesis seems to be more subtle since some of their derivatives, such as dendrogenin-A (DDA), may have anti-tumour properties (Poirot and Silvente-Poirot, 2018) while other such as 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO) can be pro-tumoral (Poirot et al., 2018). The involvement of oxysterols and metabolites in common cancers therefore represents a promising field of study to better understand certain cancers and to identify new treatments, in particular in the context of metabolic therapy (targeting for exemple cholesterol metabolism) (Sassi et al., 2021) (Griffiths and Wang, 2022), which can be considered as a promising therapy with few side effects. It should be noted that even if aging does not cause cancer, it is more common in people over 65 years of age (Serraino, 2007).

### **5.1-Breast cancer**

Breast cancer is the most common cancer in women in the world and is also the most common form of cancer (Fitzmaurice et al., 2018). In breast cancer, cholesterol metabolism as well as ceratin oxysterols (7KC, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC, CT and 27-OHC) may play an important role in tumor development and progression (Sawada et al., 2020) (**Figure 4**). In 2010, de Medina et al. identified cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) as a target for tamoxifen and anti estrogen binding site (AEBS) ligands ; they show 1) that AEBS is a hetero-oligomeric complex composed of 3beta-hydroxysterol-Delta8-Delta7-isomerase (D8D7I) and 3beta-hydroxysterol-Delta7-reductase (DHCR7) which binds different structural classes of ligands, including ring B oxysterols, 2) that the substrates of ChEH, 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC, and its product (CT) are competitive ligands of tamoxifen binding to the AEBS, and 3) that each AEBS ligand is an inhibitor of ChEH activity (de Medina et al., 2010). The 5,6-ECs are metabolized in breast cancers to the tumour promoter OCDO whereas, in normal breast tissue, they are metabolized to the tumour suppressor metabolite, DDA (de Medina et al., 2021). These data pave the way for new therapeutic strategies in breast cancer. There is evidence that 7KC and 27-OHC could contribute to drug resistance. Thus, in human breast tumour MCF-7 cells, which have a high estrogen receptor (ER) $\alpha$ /ER $\beta$  ratio, 7KC and 27-OHC decreased the toxicity of doxorubicin, and 7-KC stimulated the efflux function of P-glycoprotein (P-gp) and increases the mRNA and protein levels of P-gp (Wang et al., 2017). There are also more and

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

more evidences that 27-OHC, which can be enhanced in the plasma of postmenopausal women, and which interacts with the estrogen receptors, could contribute to breast cancer development (Nelson et al., 2014) (Biasi et al., 2022).

### **5.2-Glioblastoma**

Despite the progress made in recent years in the field of oncology, the status of glioblastoma treatment remains unsatisfactory. Glioblastoma is the most common malignant primary brain tumor and is invariably fatal to affected patients. Major challenges are the limitation of irreversible brain damage and the infiltrative part of the tumor tissue which is the ultimate cause of recurrence. At the time of recurrence, treatment options are very limited with modest activity. Oxysterols belong to a class of bioactive lipids that are implicated in neurological diseases and are associated with various tumor types (de Weille et al., 2013a) (Kloudova-Spalenkova et al., 2021). Oxysterols are potent inhibitors of the endogenous cholesterol biosynthesis in brain and show in vivo a correlation between cholesterologenesis (Wang et al., 2008) and reactive astrocyte proliferation (Velázquez et al., 2006). In addition, oxysterols can also inhibit astrogliosis and intracranial glioblastoma growth (Bochelen et al., 1995). Glioblastoma is remarkably dependent on cholesterol for survival, rendering these tumors sensitive to LXR agonist-dependent cell death (Villa et al., 2016). Some oxysterols, especially those oxidized on the lateral chain, are major activators of LXR (Janowski et al., 1996) (Janowski et al., 1999). It has been shown that LXR-mediated pathways interfere with cholesterol metabolism (Janowski et al., 1996). LXRs and SREBPs constitute a negative feedback loop to regulate the homeostasis of cellular cholesterol metabolism, and numerous studies have found that a variety of drugs alter the cholesterol levels in glioblastoma cells by acting on these two pathways (Guo et al., 2022). Oxysterols such as 24-OHC/25-OHC can inhibit cholesterol synthesis by inhibiting SREBP (Goldstein et al., 2006) (Han et al., 2020). Thus, it is not surprising that some oxysterols are able to inhibit cancer cell proliferation including glioblastoma (Guo et al., 2011). Furthermore, gene expression and lipidomic analyses revealed that LXR- $\beta$  regulates the expression of immune response gene sets and lipids known to be involved in immune modulation. Thus, therapeutic targeting of LXR- $\beta$  in glioblastoma might be effective through diverse mechanisms (Patel et al., 2019). Moreover, dysregulation of lipids in phospholipidosis inhibit glioblastoma cell proliferation and may play key roles in the induction of apoptosis by oxysterols. Anticancer activity of these compounds may be related to the immobilization of cancer cells as a result of stiffening effect

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

caused by oxysterols (Wnętrzak et al., 2021). In addition to lowering cellular cholesterol, oxysterols inhibit glioblastoma growth through multiple mechanisms. The 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OHC) induces ROS overproduction in rat C6 glioma cells, resulting in a non apoptotic mode of cell death (Sassi et al., 2019). The effect of 7 $\beta$ -OHC on the growth and mitogen-activated protein kinase (MAP)-kinase activity in C6 cell line was investigated. The MAP-kinase activity decrease is correlated with the toxic effect of 7 $\beta$ -OHC and occurs at first stages of 7 $\beta$ -OHC action (Adamczyk et al., 1998). It has also been demonstrated that 7 $\beta$ -OHC provokes transient activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in C6 cells (Clarion et al., 2012). De Weille et al., have shown that 7 $\beta$ -OHC provokes both metabolic stress, as witnessed by AMPK activation, increases cell cycle time, changes the affinity of pyruvate kinase to its substrate, phosphoenol pyruvate, and changes in lipid raft composition in C6 cells (de Weille et al., 2013b). The 7 $\beta$ -hydroxycholesteryl-3 $\beta$ -oleate possesses antitumor properties against the C6 cells injected in the frontal cortex of 6-day-old Wistar rats (Werthle et al., 1994). The effect of an analog of this molecule, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol-3 $\beta$ -O-oleyl, was investigated (Rakotoarivelo et al., 2006). The 7 $\beta$ -ether and 7 $\beta$ -ester forms displayed similar antitumor activities whereas the 7 $\beta$ -ether form was more active on well-developed glioblastoma. The 7 $\beta$ -ether form had a cytostatic rather than a cytotoxic effect. It is suggested that the absence of "etherases" enhances the antitumor activity of this type of compound. Thus, an original therapeutic approach for glioblastoma treatment may be envisaged with such compounds (Rakotoarivelo et al., 2006). Local administration of 7 $\beta$ -hydroxycholesteryl-3-oleate inhibits growth of C6 cells and might be useful for local glioblastoma chemotherapy (Werthle et al., 1994). Furthermore, 7 $\beta$ -OHC and 7 $\beta$ -hydroxycholesteryl-3-esters have anti-proliferative and anti-inflammatory properties (Bochelen et al., 1992). The 7 $\beta$ -OHC cytotoxicity has been shown in vivo and in vitro to be dependent on the accumulation of its esters (Clarion et al., 2012). Clarion et al. demonstrated that 7 $\beta$ -OHC exerts cytotoxicity in glioblastoma cells via the accumulation of 7 $\beta$ -OHC esters in lipid rafts, which triggers energy stress, activates a variety of signaling pathways, such as extracellular signal-regulated kinases (ERK), AMPK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, and finally activates the P38 signaling pathway, leading to cell death (Clarion et al., 2012). The 24S-OHC exerts different effects on U-87 MG human glioblastoma cells depending on its level. At lower concentrations it stimulates cellular processes critical to maintain redox homeostasis, while at higher dose it induces a dose dependent toxicity associated with increased reactive oxygen species production (Cigliano et al., 2019). The 25-OHC, can suppress IL-1 $\beta$  production, thus reducing inflammation but it is ineffective to

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

restore autophagy flux and to decrease apoptosis levels in human glioblastoma cell line (U87-MG) (Tricarico et al., 2017). Eibinger et al. found that 25-OHC acts as a chemokine to promote the recruitment of tumor-related macrophages (Eibinger et al., 2013), suggesting that 25-OHC may be related to tumorigenesis and tumor progression. Many studies have elucidated the effects of 27-OHC in glioblastoma. It is not surprising that its effects are conflicting, because this oxysterol can have different effects in various cancers. The 27-OHC increased the proliferation, colony formation, emigration, and invading of U251 and U118 MG cells which are human glioblastoma cell lines. In U251 and U118 MG cell lines, 27-OHC administration was likewise related to an increase in the production of glioblastoma-initiating cells. The 27-OHC has shown to increase the expression of phosphorylated MAK (pMAPK), phosphorylated mammalian target of rapamycin (pmTOR), phosphorylated AKT (pAKT), p70S6K, and YKL40 in glioblastoma cells (Liu et al., 2019). Furthermore, elevated concentrations of 27-OHC in glioblastoma tissues were linked to a poor prognosis in sufferers. Finally, 27-OHC could have a crucial function in developing glioblastoma (Abdalkareem Jasim et al., 2022). Nevertheless, other study found that 27-OHC inhibits cell viability and induces apoptosis by reducing cholesterol in C6 glioma cells (An et al., 2017). The comparative study of natural and synthetic oxysterols effects on rat C6 glioma cells underline that they can potentially constitute a new group of molecules to treat glioblastoma (Sassi et al., 2021). Therefore, we believe that some oxysterols are good candidates as new therapeutic molecules, in a context of metabolic therapy of glioblastoma, and could constitute an alternative to the currently aggressive treatments of this brain cancer (radiotherapy, chemotherapy with memantine), and/or that they could be of interest to potentialize the activity of current treatments.

#### **5.4-Myeloma**

Multiple myeloma is an haematological cancer with frequent patient relapse due to drug resistance. On JJN3 and U266 human myeloma cells and on ex vivo in myeloma patients' sorted CD138+ malignant cells, two cholesterol derivatives (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC isomers) induce a mode of cell death by oxiaoptophagy (Nury et al., 2021) through concomitant oxidative stress, caspase-3-mediated apoptosis and autophagy (Jaouadi et al., 2021). These data highlight anti-tumor activity of 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC against human myeloma cells, paving the way for future therapeutic strategies in multiple myeloma.

### **5.5. Non small cell lung cancer**

Non small cell lung cancer (NSCLC) is a leading cause of cancer often associated with metastasis and drug resistance. In patients with NSCLC, the 27-OHC content was significantly higher in the tumor region than in the non-tumor region (Takada et al., 2022). Oxy186 and Oxy210 are oxysterol derivatives (**Figure 4**). In the human NSCLC cell line A549, Oxy186 and Oxy210 inhibit WNT /  $\beta$ -catenin signaling and suppressed the proliferation of A549 cells; Oxy186 (50 mg/kg ; oral gavage ; daily) also inhibits A549 tumor growth in mice (Tang et al., 2022). Oxy210 also inhibits proliferation as well as tumor growth factor (TGF)- $\beta$  and Hedghog signaling in A549 NSCLC cells (Stappenbeck et al., 2019). In mice, Oxy210 has drug-like properties, including chemical scalability, metabolic stability and oral bioavailability in mice.

### **5.5-Prostate cancer**

Prostate cancer is the most frequent cancer of older men. More than 60% of prostate cancers appear from the age of 65, and this cancer is rare before the age of 50. Its evolution, generally slow, spreads over several years and can lead to metastases. Different treatments (surgery, radiotherapy, homonotherapy, chemotherapy) are often associated with side effects and have limited effectiveness. Developing new physical or chemical treatments is therefore a major challenge. In prostate cancer, some oxysterols and their metabolites as well as LXRs receptors may contribute to the evolution of this tumor. The oxysterols concerned are 27-OHC and CT (Kloudova et al., 2017). Treatment with the synthetic LXR agonist T0901317 downregulates the protein kinase B / AKT survival pathway and trigger apoptosis on human prostate LNCaP PCa cancer cells in both xenografted nude mice and cell culture (Pommier et al., 2010). LXRs receptors appear to be good candidates for treating prostate cancer (De Boussac et al., 2013) (Bousset et al., 2018).

### **5.6-Other types of cancer**

The oxysterols can be involved in several types of cancer, and in any cases their beneficial or detrimental effects must always be considered (Kloudova et al., 2017). 7KC could favor drug resistance by inducing P-glycoprotein expression (Wang et al., 2013). 7KC and 7 $\beta$ -OHC

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

induce cell death on different tumoral cells such as colon carcinoma cells (Roussi et al., 2006) (Roussi et al., 2007), human monocytic leukemia cells (U937) and human hepatoma cells (HepG2) (O'Callaghan et al., 2002). 22R-hydroxydesmosterol also induces cell death on hepatoma cells (Hietter et al., 1984). Noteworthy, selective cytotoxic effects of 7 $\beta$ -OHC have been reported on murine lymphomas, lymphoblasts and lymphocytes (Hietter et al., 1986). As for 27-OHC, it has beneficial or detrimental activities in breast cancer, prostate cancer, colon cancer, gastric cancer, ovarian cancer, endometrial cancer, lung cancer, melanoma, glioblastoma, thyroid cancer, adrenocortical cancer, and hepatocellular carcinoma (Abdalkareem Jasim et al., 2022).

## 6. Conclusion and perspectives

The involvement of oxysterols obtained by cholesterol autoxidation (7KC, 7 $\beta$ -OHC, 7 $\alpha$ -OHC, 4 $\beta$ -OHC, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC, CT) or enzymatically (20S-OHC, 22R-OHC, 22S-OHC, 24S-OHC, 27-OHC, 25-OHC, 7 $\alpha$ ,25 DHC) or both (7 $\alpha$ -OHC, 25-OHC) in several diseases (age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, cancer) is now well established and some oxysterol derivatives (Oxy34, 49, 133, 186, 210, 232) could be new therapeutic tools (Johnson et al., 2011) (Montgomery et al., 2014) (Ohashi et al., 2021) (Stappenbeck et al., 2019) (Tang et al., 2022) (Tang et al., 2022) (**Figure 5**). The receptors with which they may interact, the signalling pathways on which they act and the effects they induce are increasingly well known. As a result, the pharmacological interest in these poorly studied molecules is growing and oxysterol derivatives are being synthesised for therapeutic purposes. It can be expected that better knowledge of the pharmacology of oxysterols will lead to new drugs for diseases with a limited therapeutic arsenal.

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

**Funding:** This research was funded by Université de Bourgogne (Bio-peroxIL laboratory / EA7270), Région Bourgogne Franche-Comté (Projet MEDICTA, Appel à Projet Région 2020), Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne ICMUB UMR CNRS 6302. Mohamed Ksila received financial support from PHC Utique (2021-2023 Gérard Lizard



Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

/ Taoufik Ghrairi – Olfa Masmoudi - Kouki; code CMCU22G0809 / code Campus France 47608VJ).

**Acknowledgments:** Imen Ghzaïel received financial support from Nutrition Méditerranéenne et Santé Association (NMS; Prof. Emeritus Norbert Latruffe.), and Institut Européen des Antioxydants (IEA, Dr Smail Meziane). Imen Ghzaïel and Mohamed Ksila received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine; Dijon, France). Atanas G. Atanasov, Gérard Lizard, Amira Zarrouk, Imen Ghzaïel and Sonia Hammami are members of the International Natural Product Sciences Taskforce (INPST: <https://inpst.net/> accessed on 20 february 2023). The authors also thank AMeBio (Association Méditerranéenne de Biogérontologie), which reinforces the connexions between France and Tunisia, and the European Network for Oxysterol Research (ENOR; <https://www.oxysterols.net/>, founding members: Gérard Lizard and Luigi Iuliano; accessed on 20 february 2023) (Lizard et al., 2021) which contributed to collaboration between the authors.

### Figures Legends

**Figure 1 : Prevention of cataract with sterols.** Lanosterol and 25-hydroxycholesterol (25-OHC, also named 5-Cholestene-3 $\beta$ ,25-diol) clarify the lens. 25-OHC is known as VP1-001 for its use in cataract as eye drops to clarify the crystallin (<https://newdrugapprovals.org/2022/06/20/vp1-001/>, accessed on 20 february 2023). Cholesterol, which is the precursor of all oxysterols (formed either by autoxidation, enzymatically or both), is shown as reference (Mutemberezi et al., 2016).

**Figure 2 : Osteoporosis and oxysterols.** Pro-osteogenic oxysterols: 22(R)-hydroxycholesterol (22R-OHC); 22(S)hydroxycholesterol (22S-OHC); 20(S)-hydroxycholesterol (20S-OHC).; Anti-osteogenic oxysterols: 7-ketocholesterol (7KC); cholestane-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -6 $\beta$ -triol (CT); 25-OHC: 5-Cholestene-3 $\beta$ ,25-diol or 25-hydroxycholesterol; 27-hydroxycholesterol (27-OHC).

**Figure 3 : Oxysterol derivatives.** Oxy34, Oxy49 and Oxy133 are oxysterol derivatives of 20(S)-hydroxycholesterol (20S-OHC) and induce osteogenic differentiation; Oxy210 and

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

Oxy232 reduce viral replication of SARS-CoV2 as well as 7KC, 22R-OHC, 24S-OHC and 27-OHC ; Oxy210 has marked anti-inflammatory activities.

**Figure 4: Cancer, oxysterols and oxysterol derivatives.** Oxysterols with anti-tumoral activities : 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -EC), 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol (5 $\beta$ ,6 $\beta$ -EC), dendrogenine-A (DDA), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OHC); oxysterols with pro-tumoral activities : cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -triol (CT); 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO); (27-hydroxycholesterol (27-OHC) and 7-ketocholesterol are shown in Figure 2); oxysterol derivatives with anti-tumoral activities : Oxy 186 and Oxy210. CT is metabolized into OCDO by the OCDO synthase identified as 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of type 2 (11 $\beta$ -HSD2) (Poirot et al., 2018).

**Figure 5: Contribution of oxysterols in age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, and cancer.** Oxysterols can be either beneficial or detrimental in several diseases. Several oxysterol derivatives (Oxy) have anti-inflammatory (Oxy210) and anti-tumoral (Oxy186, Oxy210) activities whereas some others favor osteogenesis (Oxy34, Oxy49, Oxy133, Oxy232) (Johnson et al., 2011) (Montgomery et al., 2014) (Ohashi et al., 2021) (Stappenbeck et al., 2019) (Tang et al., 2022). Synthetic oxysterols inducing the production of 24S-OHC have been described by Zhan et al (Zhan et al., 2023).

## References

- ABDALKAREEM JASIM, S., KZAR, H. H., HAIDER HAMAD, M., AHMAD, I., AL-GAZALLY, M. E., ZIYADULLAEV, S., SIVARAMAN, R., ABED JAWAD, M., THAEER HAMMID, A., OUDAHA, K. H., KARAMPOOR, S. & MIRZAEI, R. 2022. The emerging role of 27-hydroxycholesterol in cancer development and progression: An update. *Int Immunopharmacol*, 110, 109074.
- ADAMCZYK, M., SCHERRER, E., KUPFERBERG, A., MALVIYA, A. N. & MERSEL, M. 1998. Inhibition of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by oxysterols in rat astrocyte primary cultures and C6 glioma cell lines. *J Neurosci Res*, 53, 38-50.
- AKSU, N., SAMADI, A., YALÇINKAYA, A., ÇETIN, T., ESER, B., LAY, İ., ÖZİŞ, T. N., ÖZTAŞ, Y. & SABUNCUOĞLU, S. 2020. Evaluation of oxysterol levels of patients with silicosis by LC-MS/MS method. *Mol Cell Biochem*, 467, 117-125.
- AMANTEA, C. M., KIM, W. K., MELITON, V., TETRADIS, S. & PARHAMI, F. 2008. Oxysterol-induced osteogenic differentiation of marrow stromal cells is regulated by Dkk-1 inhibitable and PI3-kinase mediated signaling. *J Cell Biochem*, 105, 424-36.
- AMARAL, J., LEE, J. W., CHOU, J., CAMPOS, M. M. & RODRÍGUEZ, I. R. 2013. 7-Ketocholesterol induces inflammation and angiogenesis in vivo: a novel rat model. *PLoS One*, 8, e56099.
- AN, Y., ZHANG, D. D., YU, H. L., MA, W. W., LU, Y. H., LIU, Q. R. & XIAO, R. 2017. 27-Hydroxycholesterol regulates cholesterol synthesis and transport in C6 glioma cells. *Neurotoxicology*, 59, 88-97.

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- ARORA, A., TASKINEN, J. H. & OLKKONEN, V. M. 2022. Coordination of inter-organelle communication and lipid fluxes by OSBP-related proteins. *Prog Lipid Res*, 86, 101146.
- BAH, S. Y., DICKINSON, P., FORSTER, T., KAMPMANN, B. & GHAZAL, P. 2017. Immune oxysterols: Role in mycobacterial infection and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 169, 152-163.
- BIASI, F., LEONI, V., GAMBA, P., SASSI, K., LIZARD, G. & POLI, G. 2022. Role of 27-hydroxycholesterol and its metabolism in cancer progression: Human studies. *Biochem Pharmacol*, 196, 114618.
- BIASI, F., MASCIA, C., ASTEGIANO, M., CHIARPOTTO, E., NANO, M., VIZIO, B., LEONARDUZZI, G. & POLI, G. 2009. Pro-oxidant and proapoptotic effects of cholesterol oxidation products on human colonic epithelial cells: a potential mechanism of inflammatory bowel disease progression. *Free Radic Biol Med*, 47, 1731-41.
- BJÖRKHEM, I. 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med*, 260, 493-508.
- BJÖRKHEM, I., HEVERIN, M., LEONI, V., MEANEY, S. & DICZFALUSY, U. 2006. Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*, 185, 43-9.
- BOCHELEN, D., ECLANCHER, F., KUPFERBERG, A., PRIVAT, A. & MERSEL, M. 1992. 7 beta-hydroxycholesterol and 7 beta-hydroxycholesteryl-3-esters reduce the extent of reactive gliosis caused by an electrolytic lesion in rat brain. *Neuroscience*, 51, 827-34.
- BOCHELEN, D., MERSEL, M., BEHR, P., LUTZ, P. & KUPFERBERG, A. 1995. Effect of oxysterol treatment on cholesterol biosynthesis and reactive astrocyte proliferation in injured rat brain cortex. *J Neurochem*, 65, 2194-200.
- BOUSSET, L., RAMBUR, A., FOUACHE, A., BUNAY, J., MOREL, L., LOBACCARO, J. A., BARON, S., TROUSSON, A. & DE JOUSSINEAU, C. 2018. New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and the Specific Role of Liver X Receptors. *Int J Mol Sci*, 19.
- BROWN, A. J., SHARPE, L. J. & ROGERS, M. J. 2021. Oxysterols: From physiological tuners to pharmacological opportunities. *Br J Pharmacol*, 178, 3089-3103.
- CARIELLO, M., PICCININ, E. & MOSCHETTA, A. 2021. Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 11, 1519-1539.
- CELHAY, O., BOUSSET, L., GUY, L., KEMENY, J. L., LEONI, V., CACCIA, C., TROUSSON, A., DAMON-SOUBEYRANT, C., DE HAZE, A., SABOURIN, L., GODFRAIND, C., DE JOUSSINEAU, C., PEREIRA, B., MOREL, L., LOBACCARO, J. M. & BARON, S. 2019. Individual Comparison of Cholesterol Metabolism in Normal and Tumour Areas in Radical Prostatectomy Specimens from Patients with Prostate Cancer: Results of the CHOMECA Study. *Eur Urol Oncol*, 2, 198-206.
- CHANG, J. Y. & LIU, L. Z. 1998. Toxicity of cholesterol oxides on cultured neuroretinal cells. *Curr Eye Res*, 17, 95-103.
- CHANG, P. Y., FELDMAN, D., STEFANICK, M. L., MCDONNELL, D. P., THOMPSON, B. M., MCDONALD, J. G. & LEE, J. S. 2019. 27-Hydroxycholesterol, an Endogenous SERM, and Risk of Fracture in Postmenopausal Women: A Nested Case-Cohort Study in the Women's Health Initiative. *J Bone Miner Res*, 34, 59-66.
- CHE, Y., YANG, J., TANG, F., WEI, Z., CHAO, Y., LI, N., LI, H., WU, S. & DONG, X. 2022. New Function of Cholesterol Oxidation Products Involved in Osteoporosis Pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 23.
- CHEN, X. J., HU, L. D., YAO, K. & YAN, Y. B. 2018. Lanosterol and 25-hydroxycholesterol dissociate crystallin aggregates isolated from cataractous human lens via different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 506, 868-873.
- CIGLIANO, L., SPAGNUOLO, M. S., NAPOLITANO, G., IANNOTTA, L., FASCILOLO, G., BARONE, D. & VENDITTI, P. 2019. 24S-hydroxycholesterol affects redox homeostasis in human glial U-87 MG cells. *Mol Cell Endocrinol*, 486, 25-33.
- CLARION, L., SCHINDLER, M., DE WEILLE, J., LOMÈDE, K., LAROCHE-CLARY, A., URO-COSTE, E., ROBERT, J., MERSEL, M. & BAKALARA, N. 2012. 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol-induced energy stress leads to sequential opposing signaling responses and to death of C6 glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol*, 83, 37-46.

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- CYSTER, J. G., DANG, E. V., REBOLDI, A. & YI, T. 2014. 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 14, 731-43.
- DASZYNSKI, D. M., SANTHOSHKUMAR, P., PHADTE, A. S., SHARMA, K. K., ZHONG, H. A., LOU, M. F. & KADOR, P. F. 2019. Failure of Oxysterols Such as Lanosterol to Restore Lens Clarity from Cataracts. *Sci Rep*, 9, 8459.
- DE BOUSSAC, H., ALIOUI, A., VIENNOIS, E., DUFOUR, J., TROUSSON, A., VEGA, A., GUY, L., VOLLE, D. H., LOBACCARO, J. M. & BARON, S. 2013. Oxysterol receptors and their therapeutic applications in cancer conditions. *Expert Opin Ther Targets*, 17, 1029-38.
- DE FREITAS, F. A., LEVY, D., ZARROUK, A., LIZARD, G. & BYDLOWSKI, S. P. 2021. Impact of Oxysterols on Cell Death, Proliferation, and Differentiation Induction: Current Status. *Cells*, 10.
- DE MEDINA, P., DIALLO, K., HUC-CLAUSTRE, E., ATTIA, M., SOULÈS, R., SILVENTE-POIROT, S. & POIROT, M. 2021. The 5,6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: Emergence of new pharmacological targets. *Br J Pharmacol*, 178, 3248-3260.
- DE MEDINA, P., PAILLASSE, M. R., SEGALA, G., POIROT, M. & SILVENTE-POIROT, S. 2010. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13520-5.
- DE MEDINA, P., SILVENTE-POIROT, S. & POIROT, M. 2022. Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Res Rev*, 77, 101615.
- DE WEILLE, J., FABRE, C. & BAKALARA, N. 2013a. Oxysterols in cancer cell proliferation and death. *Biochem Pharmacol*, 86, 154-60.
- DE WEILLE, J., FABRE, C., GAVEN, C. & BAKALARA, N. 2013b. Similar pyruvate kinase modifications in glioblastoma cells by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and glutamine withdrawal. *Biochem Pharmacol*, 86, 161-7.
- DECKER, N. S., JOHNSON, T., BEHRENS, S., OBI, N., KAAKS, R., CHANG-CLAUDE, J. & FORTNER, R. T. 2023. Association of circulating free and total oxysterols in breast cancer patients. *Clin Chem Lab Med*, 61, 285-293.
- DI FRISCO, S., DE RUGGIERI, P. & ERCOLI, A. 1953. [Isolation of cerebrosterol from human brain]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 29, 1351-2.
- DIAS, I. H., BORAH, K., AMIN, B., GRIFFITHS, H. R., SASSI, K., LIZARD, G., IRIONDO, A. & MARTINEZ-LAGE, P. 2019. Localisation of oxysterols at the sub-cellular level and in biological fluids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 193, 105426.
- DJELTI, F., BRAUDEAU, J., HUDRY, E., DHENAIN, M., VARIN, J., BIÈCHE, I., MARQUER, C., CHALI, F., AYCIRIEX, S., AUZEIL, N., ALVES, S., LANGUI, D., POTIER, M. C., LAPREVOTE, O., VIDAUD, M., DUYCKAERTS, C., MILES, R., AUBOURG, P. & CARTIER, N. 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*, 138, 2383-98.
- DUNAIEF, J. L., DENTCHEV, T., YING, G. S. & MILAM, A. H. 2002. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 120, 1435-42.
- DWYER, J. R., SEVER, N., CARLSON, M., NELSON, S. F., BEACHY, P. A. & PARHAMI, F. 2007. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 282, 8959-68.
- EIBINGER, G., FAULER, G., BERNHART, E., FRANK, S., HAMMER, A., WINTERSPERGER, A., EDER, H., HEINEMANN, A., MISCHER, P. S., MALLE, E. & SATTLER, W. 2013. On the role of 25-hydroxycholesterol synthesis by glioblastoma cell lines. Implications for chemotactic monocyte recruitment. *Exp Cell Res*, 319, 1828-1838.
- EMGÅRD, J., KAMMOUN, H., GARCÍA-CASSANI, B., CHESNÉ, J., PARIGI, S. M., JACOB, J. M., CHENG, H. W., EVREN, E., DAS, S., CZARNEWSKI, P., SLEIERS, N., MELO-GONZALEZ, F., KVEDARAITÉ, E., SVENSSON, M., SCANDELLA, E., HEPWORTH, M. R., HUBER, S., LUDEWIG, B., PEDUTO, L., VILLABLANCA, E. J., VEIGA-FERNANDES, H., PEREIRA, J. P., FLAVELL, R. A. & WILLINGER, T. 2018. Oxysterol Sensing through the Receptor GPR183 Promotes the Lymphoid-Tissue-Inducing Function of Innate Lymphoid Cells and Colonic Inflammation. *Immunity*, 48, 120-132.e8.

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- FESSLER, M. B. 2018. The challenges and promise of targeting the Liver X Receptors for treatment of inflammatory disease. *Pharmacol Ther*, 181, 1-12.
- FITZMAURICE, C., AKINYEMIJU, T. F., AL LAMI, F. H., ALAM, T., ALIZADEH-NAVAEI, R., ALLEN, C., ALSHARIF, U., ALVIS-GUZMAN, N., AMINI, E., ANDERSON, B. O., AREMU, O., ARTAMAN, A., ASGEDOM, S. W., ASSADI, R., ATEY, T. M., AVILA-BURGOS, L., AWASTHI, A., BA SALEEM, H. O., BARAC, A., BENNETT, J. R., BENSENOR, I. M., BHAKTA, N., BRENNER, H., CAHUANA-HURTADO, L., CASTAÑEDA-ORJUELA, C. A., CATALÁ-LÓPEZ, F., CHOI, J. J., CHRISTOPHER, D. J., CHUNG, S. C., CURADO, M. P., DANDONA, L., DANDONA, R., DAS NEVES, J., DEY, S., DHARMARATNE, S. D., DOKU, D. T., DRISCOLL, T. R., DUBEY, M., EBRAHIMI, H., EDESSA, D., EL-KHATIB, Z., ENDRIES, A. Y., FISCHER, F., FORCE, L. M., FOREMAN, K. J., GEBREHIWOT, S. W., GOPALANI, S. V., GROSSO, G., GUPTA, R., GYAWALI, B., HAMADEH, R. R., HAMIDI, S., HARVEY, J., HASSEN, H. Y., HAY, R. J., HAY, S. I., HEIBATI, B., HILUF, M. K., HORITA, N., HOSGOOD, H. D., ILESANMI, O. S., INNOS, K., ISLAMI, F., JAKOVljeVIC, M. B., JOHNSON, S. C., JONAS, J. B., KASAEIAN, A., KASSA, T. D., KHADER, Y. S., KHAN, E. A., KHAN, G., KHANG, Y. H., KHOSRAVI, M. H., KHUBCHANDANI, J., KOPEC, J. A., KUMAR, G. A., KUTZ, M., LAD, D. P., LAFRANCONI, A., LAN, Q., LEGESSE, Y., LEIGH, J., LINN, S., LUNEVICIUS, R., MAJEED, A., MALEKZADEH, R., MALTA, D. C., MANTOVANI, L. G., MCMAHON, B. J., MEIER, T., MELAKU, Y. A., MELKU, M., MEMIAH, P., MENDOZA, W., MERETOJA, T. J., MEZGEBE, H. B., MILLER, T. R., MOHAMMED, S., MOKDAD, A. H., MOOSAZADEH, M., et al. 2018. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 4, 1553-1568.
- FOO, C. X., BARTLETT, S. & RONACHER, K. 2022. Oxysterols in the Immune Response to Bacterial and Viral Infections. *Cells*, 11.
- GHOSH, S. & KHARE, S. K. 2017. Biodegradation of 7-Ketocholesterol by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 3951: Process optimization and enzymatic insights. *Chem Phys Lipids*, 207, 253-259.
- GHZAIEL, I., SASSI, K., ZARROUK, A., NURY, T., KSILA, M., LEONI, V., BOUHOUALA-ZAHAR, B., HAMMAMI, S., HAMMAMI, M., MACKRILL, J. J., SAMADI, M., GHRAIRI, T., VEJUX, A. & LIZARD, G. 2021. 7-Ketocholesterol: Effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 212, 105939.
- GHZAIEL, I. S., K.; ZARROUK, A.; GHOSH, S.; DIAS, I.H.K.; NURY, T.; KSILA, M.; ESSADEK, S.; TAHRI JOUTEY, M.; BRAHMI, F.; MIHOUBI, W.; RUP-JACQUES, S.; SAMADI, M.; REZIG, L.; MEZIANE, S.; GHRAIRI, T.; MASMOUDI-KOUKI, O.; HAMMAMI, S.; NASSER, B.; HAMMAMI, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W.J.; VEJUX, A.; LIZARD, G. 2022. Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: Food and biomedical applications. . *Redox Experimental Medicine*, 1 R40-R46.
- GIRÃO, H., MOTA, M. C., RAMALHO, J. & PEREIRA, P. 1998. Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res*, 66, 645-52.
- GOLDSTEIN, J. L., DEBOSE-BOYD, R. A. & BROWN, M. S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124, 35-46.
- GRIFFITHS, W. J. & WANG, Y. 2022. Cholesterol metabolism: from lipidomics to immunology. *J Lipid Res*, 63, 100165.
- GUO, D., REINITZ, F., YOUSSEF, M., HONG, C., NATHANSON, D., AKHAVAN, D., KUGA, D., AMZAJERDI, A. N., SOTO, H., ZHU, S., BABIC, I., TANAKA, K., DANG, J., IWANAMI, A., GINI, B., DEJESUS, J., LISIERO, D. D., HUANG, T. T., PRINS, R. M., WEN, P. Y., ROBINS, H. I., PRADOS, M. D., DEANGELIS, L. M., MELLINGHOFF, I. K., MEHTA, M. P., JAMES, C. D., CHAKRAVARTI, A., CLOUGHESY, T. F., TONTONOZ, P. & MISCHER, P. S. 2011. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov*, 1, 442-56.
- GUO, X., ZHOU, S., YANG, Z., LI, Z. A., HU, W., DAI, L., LIANG, W. & WANG, X. 2022. Cholesterol metabolism and its implication in glioblastoma therapy. *J Cancer*, 13, 1745-1757.

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- HAN, M., WANG, S., YANG, N., WANG, X., ZHAO, W., SAED, H. S., DAUBON, T., HUANG, B., CHEN, A., LI, G., MILETIC, H., THORSEN, F., BJERKVIG, R., LI, X. & WANG, J. 2020. Therapeutic implications of altered cholesterol homeostasis mediated by loss of CYP46A1 in human glioblastoma. *EMBO Mol Med*, 12, e10924.
- HANNEDOUCHE, S., ZHANG, J., YI, T., SHEN, W., NGUYEN, D., PEREIRA, J. P., GUERINI, D., BAUMGARTEN, B. U., ROGGO, S., WEN, B., KNOCHENMUSS, R., NOËL, S., GESSIER, F., KELLY, L. M., VANEK, M., LAURENT, S., PREUSS, I., MIAULT, C., CHRISTEN, I., KARUNA, R., LI, W., KOO, D. I., SUPLY, T., SCHMEDT, C., PETERS, E. C., FALCHETTO, R., KATOPODIS, A., SPANKA, C., ROY, M. O., DETHEUX, M., CHEN, Y. A., SCHULTZ, P. G., CHO, C. Y., SEUWEN, K., CYSTER, J. G. & SAILER, A. W. 2011. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*, 475, 524-7.
- HE, S. & NELSON, E. R. 2017. 27-Hydroxycholesterol, an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Maturitas*, 104, 29-35.
- HIETTER, H., BISCHOFF, P., BECK, J. P., OURISSON, G. & LUU, B. 1986. Comparative effects of 7 beta-hydroxycholesterol towards murine lymphomas, lymphoblasts and lymphocytes: selective cytotoxicity and blastogenesis inhibition. *Cancer Biochem Biophys*, 9, 75-83.
- HIETTER, H., TRIFILIEFF, E., RICHERT, L., BECK, J. P., LUU, B. & OURISSON, G. 1984. Antagonist action of cholesterol towards the toxicity of hydroxysterols on cultured hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 657-64.
- HOKUGO, A., SORICE, S., YALOM, A., LEE, J. C., LI, A., ZUK, P. & JARRAHY, R. 2013. In vitro study of a novel oxysterol for osteogenic differentiation on rabbit bone marrow stromal cells. *Plast Reconstr Surg*, 132, 70e-80e.
- HORWITZ, J. 1992. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10449-53.
- HUANG, C. & FRETER, C. 2015. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 16, 924-49.
- JANOWSKI, B. A., GROGAN, M. J., JONES, S. A., WISELY, G. B., KLIEWER, S. A., COREY, E. J. & MANGELSDORF, D. J. 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 266-71.
- JANOWSKI, B. A., WILLY, P. J., DEVI, T. R., FALCK, J. R. & MANGELSDORF, D. J. 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383, 728-31.
- JAOUADI, O., LIMAM, I., ABDELKARIM, M., BERRED, E., CHAHBI, A., CAILLOT, M., SOLA, B. & BEN AISSA-FENNIRA, F. 2021. 5,6-Epoxycholesterol Isomers Induce Oxiapoptophagy in Myeloma Cells. *Cancers (Basel)*, 13.
- JOFFRE, C., LECLÈRE, L., BUTEAU, B., MARTINE, L., CABARET, S., MALVITTE, L., ACAR, N., LIZARD, G., BRON, A., CREUZOT-GARCHER, C. & BRETILLON, L. 2007. Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*, 32, 271-80.
- JOHNSON, J. S., MELITON, V., KIM, W. K., LEE, K. B., WANG, J. C., NGUYEN, K., YOO, D., JUNG, M. E., ATTI, E., TETRADIS, S., PEREIRA, R. C., MAGYAR, C., NARGIZYAN, T., HAHN, T. J., FAROUZ, F., THIES, S. & PARHAMI, F. 2011. Novel oxysterols have pro-osteogenic and anti-adipogenic effects in vitro and induce spinal fusion in vivo. *J Cell Biochem*, 112, 1673-84.
- JUSAKUL, A., YONGVANIT, P., LOILOME, W., NAMWAT, N. & KUVER, R. 2011. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis*, 10, 44.
- KENIGSBERG, P.-A., ERSEK, K., GULÁCSI, L., KARPATI, K., JACQUES, A., GUSTAVSSON, A., JÖNSSON, L., MCDAID, D., VALTONEN, H. & WIMO, A. 2009. Impact socio-économique de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées en Europe. *Gérontologie et société*, 32 / 128-129, 297-318.
- KHA, H. T., BASSERI, B., SHOUHED, D., RICHARDSON, J., TETRADIS, S., HAHN, T. J. & PARHAMI, F. 2004. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat. *J Bone Miner Res*, 19, 830-40.
- KIM, W. K., MELITON, V., AMANTEA, C. M., HAHN, T. J. & PARHAMI, F. 2007. 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPARgamma expression and adipogenic differentiation of bone

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism. *J Bone Miner Res*, 22, 1711-9.
- KIM, Y. J. & LEE, C. S. 2010. Tyrosine kinase inhibitor AG126 reduces 7-ketocholesterol-induced cell death by suppressing mitochondria-mediated apoptotic process. *Neurochem Res*, 35, 603-12.
- KLOUDOVA-SPALENKOVA, A., HOLY, P. & SOUCEK, P. 2021. Oxysterols in cancer management: From therapy to biomarkers. *Br J Pharmacol*, 178, 3235-3247.
- KLOUDOVA, A., GUENGERICH, F. P. & SOUCEK, P. 2017. The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 28, 485-496.
- KOVAČ, U., SKUBIC, C., BOHINC, L., ROZMAN, D. & REŽEN, T. 2019. Oxysterols and Gastrointestinal Cancers Around the Clock. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 483.
- LEE, B. J. & AFSHARI, N. A. 2023. Advances in drug therapy and delivery for cataract treatment. *Curr Opin Ophthalmol*, 34, 3-8.
- LEE, J. S., KIM, E., HAN, S., KANG, K. L. & HEO, J. S. 2017. Evaluating the oxysterol combination of 22(S)-hydroxycholesterol and 20(S)-hydroxycholesterol in periodontal regeneration using periodontal ligament stem cells and alveolar bone healing models. *Stem Cell Res Ther*, 8, 276.
- LÉGER-CHARNAY, E., MASSON, E. A. Y., MORALA, T., MARTINE, L., BUTEAU, B., LECLERE, L., BRETILLON, L. & GAMBERT, S. 2019. Is 24(S)-hydroxycholesterol a potent modulator of cholesterol metabolism in Müller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina. *Exp Eye Res*, 189, 107857.
- LEMBO, D., CAGNO, V., CIVRA, A. & POLI, G. 2016. Oxysterols: An emerging class of broad spectrum antiviral effectors. *Mol Aspects Med*, 49, 23-30.
- LEONI, V. & CACCIA, C. 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*, 164, 515-24.
- LIAN, R. R. & AFSHARI, N. A. 2020. The quest for homeopathic and nonsurgical cataract treatment. *Curr Opin Ophthalmol*, 31, 61-66.
- LIU, C., YANG, X. V., WU, J., KUEI, C., MANI, N. S., ZHANG, L., YU, J., SUTTON, S. W., QIN, N., BANIE, H., KARLSSON, L., SUN, S. & LOVENBERG, T. W. 2011. Oxysterols direct B-cell migration through EB12. *Nature*, 475, 519-23.
- LIU, H., YUAN, L., XU, S., WANG, K. & ZHANG, T. 2005. Cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 96, 198-208.
- LIU, L., LI, M. Y., XING, Y., WANG, X. Y. & WANG, Y. 2019. The oncogenic roles of 27-hydroxycholesterol in glioblastoma. *Oncol Lett*, 18, 3623-3629.
- LIZARD, G., POIROT, M. & IULIANO, L. 2021. European network for oxysterol research (ENOR): 10 th anniversary. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 214, 105996.
- LOERA-VALENCIA, R., GOIKOLEA, J., PARRADO-FERNANDEZ, C., MERINO-SERRAIS, P. & MAIOLI, S. 2019. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 190, 104-114.
- LU, A., DUAN, P., XIE, J., GAO, H., CHEN, M., GONG, Y., LI, J. & XU, H. 2022. Recent progress and research trend of anti-cataract pharmacology therapy: A bibliometric analysis and literature review. *Eur J Pharmacol*, 934, 175299.
- MA, C., HONG, F. & YANG, S. 2022. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules*, 27.
- MALVITTE, L., MONTANGE, T., JOFFRE, C., VEJUX, A., MAÍZA, C., BRON, A., CREUZOT-GARCHER, C. & LIZARD, G. 2006. [Analogies between atherosclerosis and age-related maculopathy: expected roles of oxysterols]. *J Fr Ophtalmol*, 29, 570-8.
- MALVITTE, L., MONTANGE, T., VEJUX, A., JOFFRE, C., BRON, A., CREUZOT-GARCHER, C. & LIZARD, G. 2008. Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7beta-hydroxycholesterol. *Curr Eye Res*, 33, 769-81.
- MARCELLO, A., CIVRA, A., MILAN BONOTTO, R., NASCIMENTO ALVES, L., RAJASEKHARAN, S., GIACOBONE, C., CACCIA, C., CAVALLI, R., ADAMI, M., BRAMBILLA, P., LEMBO, D., POLI, G. &

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- LEONI, V. 2020. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol inhibits SARS-CoV-2 and is markedly decreased in COVID-19 patients. *Redox Biol*, 36, 101682.
- MOLNAR, K. S., DUNYAK, B. M., SU, B., IZRAYELIT, Y., MCGLASSON-NAUMANN, B., HAMILTON, P. D., QIAN, M., COVEY, D. F., GESTWICKI, J. E., MAKLEY, L. N. & ANDLEY, U. P. 2019. Mechanism of Action of VP1-001 in cryAB(R120G)-Associated and Age-Related Cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 60, 3320-3331.
- MONTGOMERY, S. R., NARGIZYAN, T., MELITON, V., NACHTERGAELE, S., ROHATGI, R., STAPPENBECK, F., JUNG, M. E., JOHNSON, J. S., AGHDASI, B., TIAN, H., WEINTRAUB, G., INOUE, H., ATTI, E., TETRADIS, S., PEREIRA, R. C., HOKUGO, A., ALOBAIDAAN, R., TAN, Y., HAHN, T. J., WANG, J. C. & PARHAMI, F. 2014. A novel osteogenic oxysterol compound for therapeutic development to promote bone growth: activation of hedgehog signaling and osteogenesis through smoothed binding. *J Bone Miner Res*, 29, 1872-85.
- MOSETI, D., REGASSA, A., CHEN, C., O, K. & KIM, W. K. 2020. 25-Hydroxycholesterol Inhibits Adipogenic Differentiation of C3H10T1/2 Pluripotent Stromal Cells. *Int J Mol Sci*, 21.
- MUTEMBEREZI, V., GUILLEMOT-LEGRIS, O. & MUCCIOLI, G. G. 2016. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res*, 64, 152-169.
- NELSON, E. R., CHANG, C. Y. & MCDONNELL, D. P. 2014. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 649-55.
- NURY, T., ZARROUK, A., YAMMINE, A., MACKRILL, J. J., VEJUX, A. & LIZARD, G. 2021. Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *Br J Pharmacol*, 178, 3115-3123.
- O'CALLAGHAN, Y. C., WOODS, J. A. & O'BRIEN, N. M. 2002. Characteristics of 7 beta-hydroxycholesterol-induced cell death in a human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. *Toxicol In Vitro*, 16, 245-51.
- OFFEI, S. D., ARMAN, H. D. & YOSHIMOTO, F. K. 2019. Chemical synthesis of 7 $\alpha$ -hydroxycholest-4-en-3-one, a biomarker for irritable bowel syndrome and bile acid malabsorption. *Steroids*, 151, 108449.
- OHASHI, H., WANG, F., STAPPENBECK, F., TSUCHIMOTO, K., KOBAYASHI, C., SASO, W., KATAOKA, M., YAMASAKI, M., KURAMOCHI, K., MURAMATSU, M., SUZUKI, T., SUREAU, C., TAKEDA, M., WAKITA, T., PARHAMI, F. & WATASHI, K. 2021. Identification of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Oxysterol Derivatives In Vitro. *Int J Mol Sci*, 22.
- OLKKONEN, V. M. & IKONEN, E. 2022. Cholesterol transport in the late endocytic pathway: Roles of ORP family proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 216, 106040.
- ONG, J. M., AOKI, A. M., SEIGEL, G. M., SACERIO, I., CASTELLON, R., NESBURN, A. B. & KENNEY, M. C. 2003. Oxysterol-induced toxicity in R28 and ARPE-19 cells. *Neurochem Res*, 28, 883-91.
- PARIENTE, A., PELÁEZ, R., PÉREZ-SALA, Á. & LARRÁYOZ, I. M. 2019. Inflammatory and cell death mechanisms induced by 7-ketocholesterol in the retina. Implications for age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 187, 107746.
- PARONI, G., BISCEGLIA, P. & SERIPA, D. 2019. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 68, 493-510.
- PASCUAL-GARCÍA, M. & VALLEDOR, A. F. 2012. Biological roles of liver X receptors in immune cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60, 235-49.
- PATEL, D., AHMAD, F., KAMBACH, D. M., SUN, Q., HALIM, A. S., KRAMP, T., CAMPHAUSEN, K. A. & STOMMEL, J. M. 2019. LXR $\beta$  controls glioblastoma cell growth, lipid balance, and immune modulation independently of ABCA1. *Sci Rep*, 9, 15458.
- PETROV, A. M., ASTAFEV, A. A., MAST, N., SAADANE, A., EL-DARZI, N. & PIKULEVA, I. A. 2019. The Interplay between Retinal Pathways of Cholesterol Output and Its Effects on Mouse Retina. *Biomolecules*, 9.
- PIKULEVA, I. A. & CARTIER, N. 2021. Cholesterol Hydroxylating Cytochrome P450 46A1: From Mechanisms of Action to Clinical Applications. *Front Aging Neurosci*, 13, 696778.



Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- POIROT, M. & SILVENTE-POIROT, S. 2018. The tumor-suppressor cholesterol metabolite, dendrogenin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers. *Biochem Pharmacol*, 153, 75-81.
- POIROT, M., SOULES, R., MALLINGER, A., DALENC, F. & SILVENTE-POIROT, S. 2018. Chemistry, biochemistry, metabolic fate and mechanism of action of 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), a tumor promoter and cholesterol metabolite. *Biochimie*, 153, 139-149.
- POMMIER, A. J., ALVES, G., VIENNOIS, E., BERNARD, S., COMMUNAL, Y., SION, B., MARCEAU, G., DAMON, C., MOUZAT, K., CAIRA, F., BARON, S. & LOBACCARO, J. M. 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene*, 29, 2712-23.
- RAJAGOPAL, P., TSE, E., BORST, A. J., DELBECQ, S. P., SHI, L., SOUTHWORTH, D. R. & KLEVIT, R. E. 2015. A conserved histidine modulates HSPB5 structure to trigger chaperone activity in response to stress-related acidosis. *Elife*, 4.
- RAKOTOARIVELO, C., ADAMCZYK, M., DESGEORGES, M., LANGLEY, K., LORENTZ, J. G., MANN, A., RICARD, D., SCHERRER, E., PRIVAT, A. & MERSEL, M. 2006. 7 $\beta$ -hydroxycholesterol blocked at C-3-OH inhibits growth of rat glioblastoma in vivo: comparison between 7 $\beta$ -hydroxycholesteryl-3 $\beta$  (ester)-oleate and 7 $\beta$ -hydroxycholesteryl-3- $\beta$ -O (ether)-oleyl. *Anticancer Res*, 26, 2053-62.
- RASELLI, T., WYSS, A., GONZALEZ ALVARADO, M. N., WEDER, B., MAMIE, C., SPALINGER, M. R., VAN HAAFTEN, W. T., DIJKSTRA, G., SAILER, A. W., IMENEZ SILVA, P. H., WAGNER, C. A., TOSEVSKI, V., LEIBL, S., SCHARL, M., ROGLER, G., HAUSMANN, M. & MISSELWITZ, B. 2019. The Oxysterol Synthesising Enzyme CH25H Contributes to the Development of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*, 13, 1186-1200.
- REYES, L. P., REYES, T. C., DUEÑAS, Z., DURAN, D., PERDOMO, S. & AVILA, M. Y. 2023. Expression of oxysterols in human lenses: Implications of the sterol pathway in age-related cataracts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 225, 106200.
- RICHARDSON, J. A., AMANTEA, C. M., KIANMAHD, B., TETRADIS, S., LIEBERMAN, J. R., HAHN, T. J. & PARHAMI, F. 2007. Oxysterol-induced osteoblastic differentiation of pluripotent mesenchymal cells is mediated through a PKC- and PKA-dependent pathway. *J Cell Biochem*, 100, 1131-45.
- RODRIGUEZ, I. R., ALAM, S. & LEE, J. W. 2004. Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein in cultured RPE cells is dependent on the formation of 7-ketocholesterol. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 2830-7.
- RODRIGUEZ, I. R., CLARK, M. E., LEE, J. W. & CURCIO, C. A. 2014. 7-ketocholesterol accumulates in ocular tissues as a consequence of aging and is present in high levels in drusen. *Exp Eye Res*, 128, 151-5.
- RODRÍGUEZ, I. R. & LARRAYOZ, I. M. 2010. Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J Lipid Res*, 51, 2847-62.
- ROUSSI, S., GOSSÉ, F., AOUDE-WERNER, D., ZHANG, X., GEOFFROY, P., MIESCH, M., MARCHIONI, E. & RAUL, F. 2006. Perturbation of polyamine metabolism and its relation to cell death in human colon cancer cells treated by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7 $\beta$ -hydroxysterol. *Int J Oncol*, 29, 1549-54.
- ROUSSI, S., GOSSÉ, F., AOUDE-WERNER, D., ZHANG, X., MARCHIONI, E., GEOFFROY, P., MIESCH, M. & RAUL, F. 2007. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 $\beta$ -hydroxysterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis*, 12, 87-96.
- SAMADI, A., SABUNCUOGLU, S., SAMADI, M., ISIKHAN, S. Y., CHIRUMBOLO, S., PEANA, M., LAY, I., YALCINKAYA, A. & BJØRKLUND, G. 2021. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Curr Med Chem*, 28, 110-136.

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

SASSI, K., NURY, T., SAMADI, M., FENNIRA, F. B. A., VEJUX, A. & LIZARD, G. 2021. Cholesterol Derivatives as Promising Anticancer Agents in Glioblastoma Metabolic Therapy. *In: DEBINSKI, W. (ed.) Gliomas*. Brisbane (AU): Exon Publications

Copyright: The Authors.

SASSI, K., NURY, T., ZARROUK, A., SGHAIER, R., KHALAFI-NEZHAD, A., VEJUX, A., SAMADI, M., AISSA-FENNIRA, F. B. & LIZARD, G. 2019. Induction of a non-apoptotic mode of cell death associated with autophagic characteristics with steroidal maleic anhydrides and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol on glioma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 191, 105371.

SATO, R. 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys*, 501, 177-81.

SAWADA, M. I., GD, S. F. & PASSARELLI, M. 2020. Cholesterol derivatives and breast cancer: oxysterols driving tumor growth and metastasis. *Biomark Med*, 14, 1299-1302.

SEO, Y. S., CHO, I. A., KIM, T. H., YOU, J. S., OH, J. S., LEE, G. J., KIM, D. K. & KIM, J. S. 2020. Oxysterol 25-hydroxycholesterol as a metabolic pathophysiological factors of osteoarthritis induces apoptosis in primary rat chondrocytes. *Korean J Physiol Pharmacol*, 24, 249-257.

SEO, Y. S., KANG, K. R., LIM, H., SEO, J. Y., KIM, D. K. & KIM, J. S. 2023. 25-Hydroxycholesterol-induced Osteoblast Oxiapoptophagy Is Involved in the Pathophysiological Process of Osteoporosis. *In Vivo*, 37, 204-217.

SERRAINO, D. 2007. [Ageing and cancer: association or causality?]. *Med Sci (Paris)*, 23 Spec No 3, 26-8.

SHOUHED, D., KHA, H. T., RICHARDSON, J. A., AMANTEA, C. M., HAHN, T. J. & PARHAMI, F. 2005. Osteogenic oxysterols inhibit the adverse effects of oxidative stress on osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 95, 1276-83.

SILVENTE-POIROT, S. & POIROT, M. 2012. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 12, 696-703.

SJÖGREN, M., MIELKE, M., GUSTAFSON, D., ZANDI, P. & SKOOG, I. 2006. Cholesterol and Alzheimer's disease--is there a relation? *Mech Ageing Dev*, 127, 138-47.

SKINNER, C. & MIRALDI UTZ, V. 2017. Pharmacological approaches to restoring lens transparency: Real world applications. *Ophthalmic Genet*, 38, 201-205.

SPANN, N. J. & GLASS, C. K. 2013. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol*, 14, 893-900.

STAPPENBECK, F., WANG, F., TANG, L. Y., ZHANG, Y. E. & PARHAMI, F. 2019. Inhibition of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Oxy210, an Oxysterol-Derivative that Antagonizes TGF $\beta$  and Hedgehog Signaling. *Cells*, 8.

TAKADA, I., MIYAZAKI, T., GOTO, Y., KANZAWA, H., MATSUBARA, T., NAMIKAWA-KANAI, H., SHIGEFUKU, S., ONO, S., NAKAJIMA, E., MORISHITA, Y., HONDA, A., FURUKAWA, K. & IKEDA, N. 2022. Involvement of 27-hydroxycholesterol on the progression of non-small cell lung cancer via the estrogen receptor. *Am J Cancer Res*, 12, 4241-4253.

TANG, L. Y., SPEZIA, M., CHEN, T., SHIN, J. H., WANG, F., STAPPENBECK, F., LEBENSOHN, A. M., PARHAMI, F. & ZHANG, Y. E. 2022. Oxysterol derivatives Oxy186 and Oxy210 inhibit WNT signaling in non-small cell lung cancer. *Cell Biosci*, 12, 119.

TESTA, G., ROSSIN, D., POLI, G., BIASI, F. & LEONARDUZZI, G. 2018. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie*, 153, 220-231.

TESTA, G., STAURENGHI, E., ZERBINATI, C., GARGIULO, S., IULIANO, L., GIACCONE, G., FANTÒ, F., POLI, G., LEONARDUZZI, G. & GAMBA, P. 2016. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol*, 10, 24-33.

TRICARICO, P. M., GRATTON, R., BRAGA, L., CELSI, F. & CROVELLA, S. 2017. 25-Hydroxycholesterol and inflammation in Lovastatin-deregulated mevalonate pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 92, 26-33.

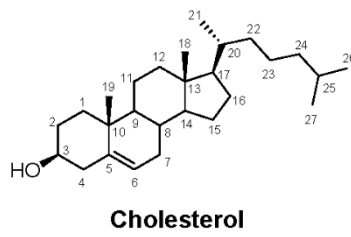
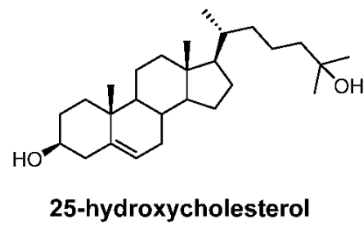
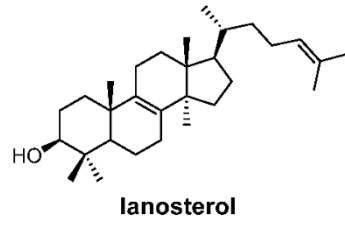
TRINDADE, B. C., CEGLIA, S., BERTHELETTE, A., RASO, F., HOWLEY, K., MUPPIDI, J. R. & REBOLDI, A. 2021. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol restrains the transcriptional

Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- regulator SREBP2 and limits intestinal IgA plasma cell differentiation. *Immunity*, 54, 2273-2287.e6.
- VAYA, J. & SCHIPPER, H. M. 2007. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem*, 102, 1727-1737.
- VEJUX, A. & LIZARD, G. 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med*, 30, 153-70.
- VEJUX, A., SAMADI, M. & LIZARD, G. 2011. Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract: implication for the development of pharmacological treatments. *J Ophthalmol*, 2011, 471947.
- VELÁZQUEZ, E., SANTOS, A., MONTES, A., BLÁZQUEZ, E. & RUIZ-ALBUSAC, J. M. 2006. 25-Hydroxycholesterol has a dual effect on the proliferation of cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology*, 51, 229-37.
- VIENNOIS, E., POMMIER, A. J., MOUZAT, K., OUMEDDOUR, A., EL HAJAJI, F. Z., DUFOUR, J., CAIRA, F., VOLLE, D. H., BARON, S. & LOBACCARO, J. M. 2011. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets*, 15, 219-32.
- VILLA, G. R., HULCE, J. J., ZANCA, C., BI, J., IKEGAMI, S., CAHILL, G. L., GU, Y., LUM, K. M., MASUI, K., YANG, H., RONG, X., HONG, C., TURNER, K. M., LIU, F., HON, G. C., JENKINS, D., MARTINI, M., ARMANDO, A. M., QUEHENBERGER, O., CLOUGHESY, T. F., FURNARI, F. B., CAVENEE, W. K., TONTONOZ, P., GAHMAN, T. C., SHIAU, A. K., CRAVATT, B. F. & MISCHER, P. S. 2016. An LXR-Cholesterol Axis Creates a Metabolic Co-Dependency for Brain Cancers. *Cancer Cell*, 30, 683-693.
- WANG, C. W., HUANG, C. C., CHOU, P. H., CHANG, Y. P., WEI, S., GUENGERICH, F. P., CHOU, Y. C., WANG, S. F., LAI, P. S., SOUČEK, P. & UENG, Y. F. 2017. 7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway. *Oncotarget*, 8, 66033-66050.
- WANG, F., STAPPENBECK, F., TANG, L. Y., ZHANG, Y. E., HUI, S. T., LUSIS, A. J. & PARHAMI, F. 2022a. Oxy210, a Semi-Synthetic Oxysterol, Exerts Anti-Inflammatory Effects in Macrophages via Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) 4 and TLR2 Signaling and Modulation of Macrophage Polarization. *Int J Mol Sci*, 23.
- WANG, H. L., WANG, Y. Y., LIU, X. G., KUO, S. H., LIU, N., SONG, Q. Y. & WANG, M. W. 2016. Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 51, 45-55.
- WANG, K., HOSHINO, M., UESUGI, K., YAGI, N., PIERSCIONEK, B. K. & ANDLEY, U. P. 2022b. Oxysterol Compounds in Mouse Mutant  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-Crystallin Lenses Can Improve the Optical Properties of the Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 63, 15.
- WANG, S., LI, W., HUI, H., TIWARI, S. K., ZHANG, Q., CROKER, B. A., RAWLINGS, S., SMITH, D., CARLIN, A. F. & RANA, T. M. 2020. Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS-CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol. *Embo j*, 39, e106057.
- WANG, S. F., CHOU, Y. C., MAZUMDER, N., KAO, F. J., NAGY, L. D., GUENGERICH, F. P., HUANG, C., LEE, H. C., LAI, P. S. & UENG, Y. F. 2013. 7-Ketocholesterol induces P-glycoprotein through PI3K/mTOR signaling in hepatoma cells. *Biochem Pharmacol*, 86, 548-60.
- WANG, Y., KUMAR, N., CRUMBLEY, C., GRIFFIN, P. R. & BURRIS, T. P. 2010. A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim Biophys Acta*, 1801, 917-23.
- WANG, Y., ROGERS, P. M., SU, C., VARGA, G., STAYROOK, K. R. & BURRIS, T. P. 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem*, 283, 26332-9.
- WERTHLE, M., BOCHELEN, D., ADAMCZYK, M., KUPFERBERG, A., POULET, P., CHAMBRON, J., LUTZ, P., PRIVAT, A. & MERSEL, M. 1994. Local administration of 7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate inhibits growth of experimental rat C6 glioblastoma. *Cancer Res*, 54, 998-1003.

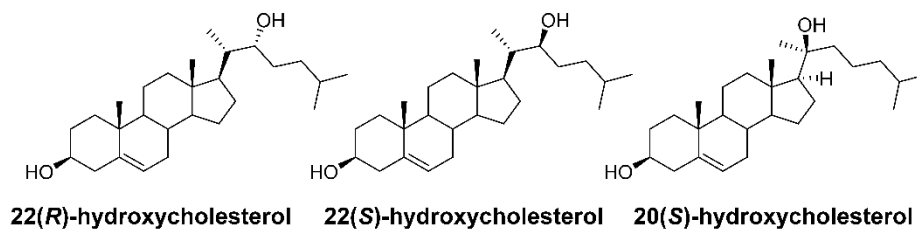
Oxysterols and Phytosterols in Human Health (Springer; Editor, Gérard Lizard)

- WNĘTRZAK, A., KUBISIAK, A., FILICZKOWSKA, A., GONET-SURÓWKA, A., CHACHAJ-BREKIESZ, A., TARGOSZ-KORECKA, M. & DYNAROWICZ-LATKA, P. 2021. Can oxysterols work in anti-glioblastoma therapy? Model studies complemented with biological experiments. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1863, 183773.
- XU, J., FU, Q., CHEN, X. & YAO, K. 2020. Advances in pharmacotherapy of cataracts. *Ann Transl Med*, 8, 1552.
- YU, X. H., JIANG, N., YAO, P. B., ZHENG, X. L., CAYABYAB, F. S. & TANG, C. K. 2014. NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 429, 69-75.
- ZANG, R., CASE, J. B., YUTUC, E., MA, X., SHEN, S., GOMEZ CASTRO, M. F., LIU, Z., ZENG, Q., ZHAO, H., SON, J., ROTHLAUF, P. W., KREUTZBERGER, A. J. B., HOU, G., ZHANG, H., BOSE, S., WANG, X., VAHEY, M. D., MANI, K., GRIFFITHS, W. J., KIRCHHAUSEN, T., FREMONT, D. H., GUO, H., DIWAN, A., WANG, Y., DIAMOND, M. S., WHELAN, S. P. J. & DING, S. 2020. Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 32105-32113.
- ZARROUK, A., DEBBABI, M., BEZINE, M., KARYM, E. M., BADREDDINE, A., ROUAUD, O., MOREAU, T., CHERKAOUI-MALKI, M., EL AYE, M., NASSER, B., HAMMAMI, M. & LIZARD, G. 2018. Lipid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*, 15, 303-312.
- ZARROUK, A., HAMMOUDA, S., GHZAIEL, I., HAMMAMI, S., KHAMLAOUI, W., AHMED, S. H., LIZARD, G. & HAMMAMI, M. 2020. Association Between Oxidative Stress and Altered Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease Patients. *Curr Alzheimer Res*, 17, 823-834.
- ZARROUK, A., VEJUX, A., MACKRILL, J., O'CALLAGHAN, Y., HAMMAMI, M., O'BRIEN, N. & LIZARD, G. 2014. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev*, 18, 148-62.
- ZHAN, N., WANG, B., MARTENS, N., LIU, Y., ZHAO, S., VOORTMAN, G., VAN ROOIJ, J., LEUTEN, F., VANMIERLO, T., KUIPERS, F., JONKER, J. W., BLOKS, V. W., LÜTJOHANN, D., PALUMBO, M., ZIMETTI, F., ADORNI, M. P., LIU, H. & MULDER, M. T. 2023. Identification of Side Chain Oxidized Sterols as Novel Liver X Receptor Agonists with Therapeutic Potential in the Treatment of Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 24.
- ZHANG, X., ALHASANI, R. H., ZHOU, X., REILLY, J., ZENG, Z., STRANG, N. & SHU, X. 2021. Oxysterols and retinal degeneration. *Br J Pharmacol*, 178, 3205-3219.
- ZHAO, L., CHEN, X. J., ZHU, J., XI, Y. B., YANG, X., HU, L. D., OUYANG, H., PATEL, S. H., JIN, X., LIN, D., WU, F., FLAGG, K., CAI, H., LI, G., CAO, G., LIN, Y., CHEN, D., WEN, C., CHUNG, C., WANG, Y., QIU, A., YEH, E., WANG, W., HU, X., GROB, S., ABAGYAN, R., SU, Z., TJONDRO, H. C., ZHAO, X. J., LUO, H., HOU, R., JEFFERSON, J., PERRY, P., GAO, W., KOZAK, I., GRANET, D., LI, Y., SUN, X., WANG, J., ZHANG, L., LIU, Y., YAN, Y. B. & ZHANG, K. 2015. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*, 523, 607-11.
- ZOLA, M., MEJLACHOWICZ, D., GREGORIO, R., NAUD, M. C., JAISSE, F., ZHAO, M. & BEHAR-COHEN, F. 2022. Chronic Systemic Dexamethasone Regulates the Mineralocorticoid/Glucocorticoid Pathways Balance in Rat Ocular Tissues. *Int J Mol Sci*, 23.
- ZU, S., DENG, Y. Q., ZHOU, C., LI, J., LI, L., CHEN, Q., LI, X. F., ZHAO, H., GOLD, S., HE, J., LI, X., ZHANG, C., YANG, H., CHENG, G. & QIN, C. F. 2020. 25-Hydroxycholesterol is a potent SARS-CoV-2 inhibitor. *Cell Res*, 30, 1043-1045.

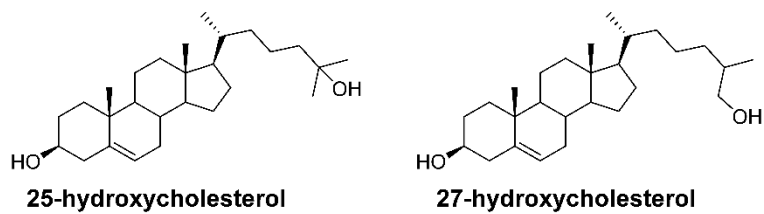
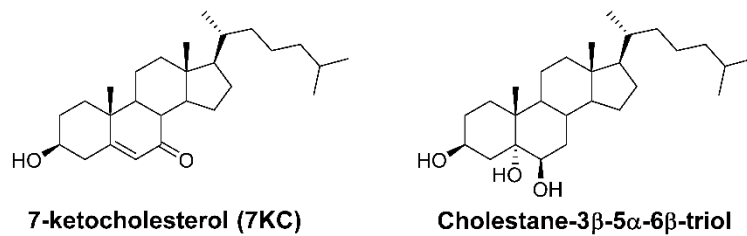


KSILA M et al – Figure 1

- Pro-osteogenic oxysterols

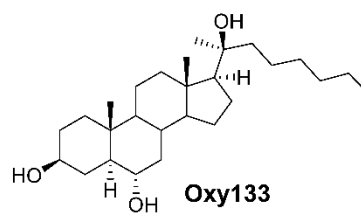
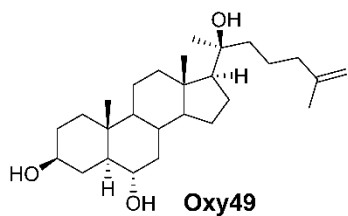
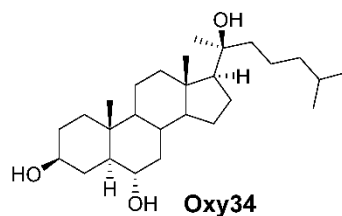
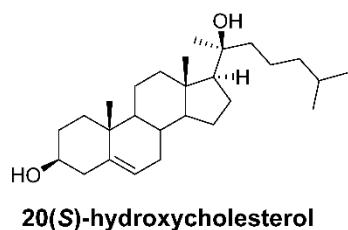


- Anti-osteogenic oxysterols

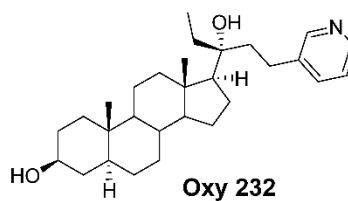
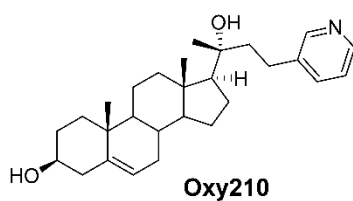


KSILA M et al, Figure 2

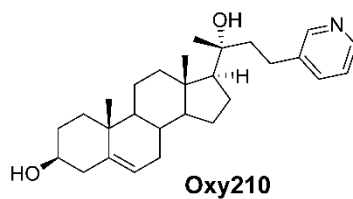
- Oxysterol derivatives obtained from 20(S)-hydroxycholesterol with pro-osteogenic activities



- Oxysterol derivatives inhibiting viral replication of SARS-CoV2

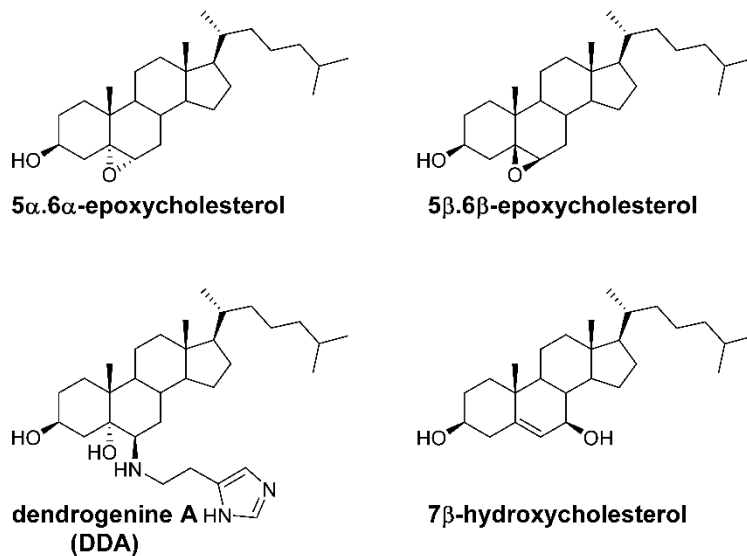


- Anti-inflammatory oxysterol derivative

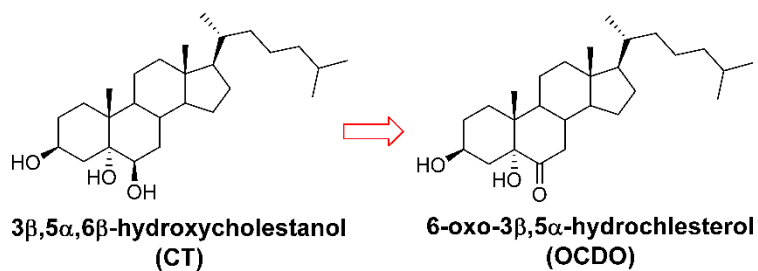


KSILA M et al, Figure 3

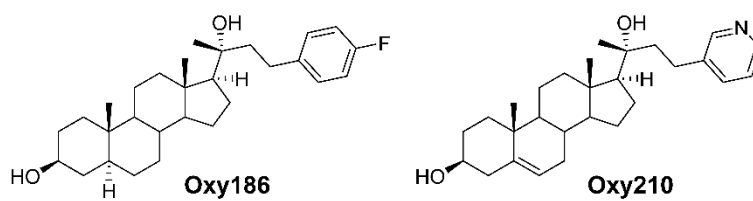
- Oxysterols with anti-tumoral activities



- Oxysterols with pro-tumoral activities

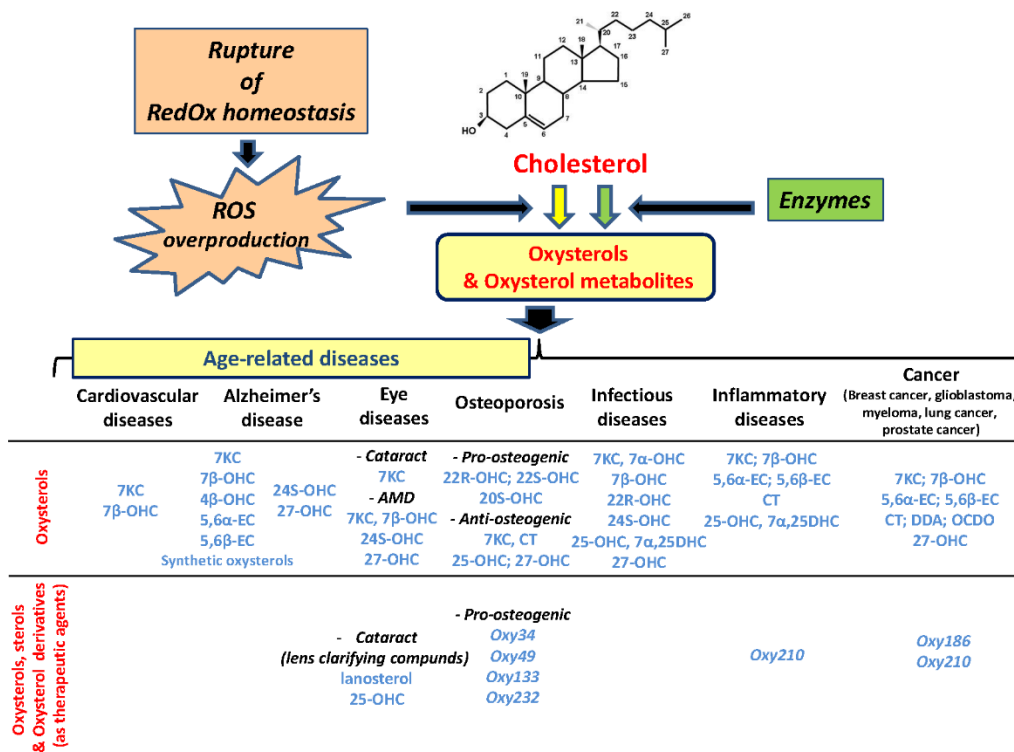


- Oxysterols derivatives with anti-tumoral activities



KSILA M et al, Figure 4







Springer-Verlag, P.O. Box 10 52 80, 69042 Heidelberg, Germany

**Mohamed Ksila**  
University of Bourgogne, Inserm  
21000 Dijon, France  
University Tunis El Manar,  
2092 Tunis, Tunisia

2 June 2023

#### Certificate of Co-Authorship

Dear Mr. Ksila,

This is a letter to confirm your contribution as first author of the chapter entitled '*Therapeutic applications of oxysterols and derivatives in age-related diseases, infectious and inflammatory diseases, and cancer*' together with Imen Ghzaïel, Khoulood Sassi, Amira Zarrouk, Valerio Leoni, Giuseppe Poli, Leila Rezig, Vivien Pires, Smail Meziane, Atanas G. Atanasov, Sonia Hammami, Mohamed Hammami, Olfa Masmoudi-Kouki, Oumaima Hamdi, Pierre Jouanny, Mohammad Samadi, Anne Vejux, Taoufik Ghraïri and Gérard Lizard. The chapter will be part of the book 'Oxysterols and phytosterols in human health' edited by Prof. Gérard Lizard. This book is currently in development in collaboration with Springer Nature.

With kind regards,  
Ina Stoeck, Ph.D.

**Springer-Verlag GmbH**  
Tiergartenstrasse 17  
69121 Heidelberg, Germany  
P.O. Box 10 52 80  
69042 Heidelberg, Germany  
**T** +49 6221 487 0  
**F** +49 6221 487 8366  
www.springer.com

**Dr. Ina Karen Stoeck**  
Editor - Neuroscience and Cancer Research  
**T** +49 6221 487 9034  
**M** +49 175 716 1259  
ina.stoeck@springer.com