



**HAL**  
open science

# Les stilbènes de la Vigne : rôle de leur métabolisme et de leurs interactions dans les activités anti-inflammatoires et antioxydantes

Biranty Sy

## ► To cite this version:

Biranty Sy. Les stilbènes de la Vigne : rôle de leur métabolisme et de leurs interactions dans les activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0498 . tel-04485950

**HAL Id: tel-04485950**

**<https://theses.hal.science/tel-04485950>**

Submitted on 1 Mar 2024

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE NUTRITION

Par Biranty SY

**Les stilbènes de la vigne : rôle de leur métabolisme et de leurs interactions  
dans les activités anti-inflammatoires et antioxydantes**

Sous la direction du Dr Arnaud COURTOIS

Soutenue le 22 Décembre 2023

Membres du jury :

Mme. PORTILLO Maria Puy	Professeur, Université du Pays Basque, Espagne	Rapporteur
Mme. PAIN Stéphanie	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M. ATGIE Claude	Professeur, Université de Bordeaux	Examinateur
M. COURTOIS Arnaud	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mme. KRISA Stéphanie	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Invitée



# Titre : Les stilbènes de la Vigne : rôle de leur métabolisme et de leurs interactions dans les activités anti-inflammatoires et antioxydantes

## Résumé :

Les stilbènes sont une famille de polyphénols que l'on retrouve, entre autres, dans la vigne et le vin. Le resvératrol, molécule phare de cette famille, est à l'origine de la formation de nombreux dérivés. Le resvératrol et ses oligomères sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Ces activités sont en partie à l'origine des effets cardioprotecteurs, antiobésités, anticancéreux et neuroprotecteurs des stilbènes observés *in vivo*, malgré une très faible biodisponibilité qui s'explique en partie par un métabolisme intestinal et hépatique important que nous avons montré au laboratoire. Ce fait suggère que certains métabolites des stilbènes pourraient être eux-mêmes actifs et participer à l'activité globale de ces composés. Généralement, la majorité des études se focalise sur l'utilisation de stilbènes en tant que composés individuels. Cependant dans notre alimentation ou dans le domaine de la nutraceutique, ces molécules existent souvent sous formes de mélanges complexes dans des extraits et peuvent interagir entre elles. Ce faisant, ces interactions peuvent soit augmenter ou diminuer les activités biologiques globales des stilbènes au sein du mélange. Au cours des deux dernières décennies, une centaine d'études ont évalué les interactions entre les polyphénols de différentes familles. Les interactions entre stilbènes n'ont par contre été que peu rapportées et restent à déterminer. Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'une part d'étudier les interactions entre le resvératrol et deux de ses oligomères à savoir l' $\epsilon$ -viniférine (un dimère) et la vitisine B (un tétramère) puis d'autre part de caractériser le métabolisme de ces composés afin de déterminer les implications de ces phénomènes dans leur propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Les interactions ont été étudiées dans un modèle acellulaire et dans un modèle cellulaire de macrophages de rat (RAW 264.7). Concernant le modèle acellulaire, nous avons évalué les activités antiradicalaires pour les stilbènes individuels et pour leurs combinaisons équimolaires. Concernant le modèle cellulaire, nous avons évalué les activités anti-inflammatoires et antioxydantes des stilbènes individuels et leurs combinaisons dans des cellules RAW 264.7 stimulées par le LPS. Le métabolisme de ces stilbènes a été mesuré dans les macrophages RAW 264.7 stimulés ou non par le LPS. Nous avons montré que les stilbènes présentaient individuellement des activités antiradicalaires, antioxydantes et anti-inflammatoires et que ces effets se différenciaient les uns des autres selon le modèle utilisé. En général les interactions entre les stilbènes sont de nature additives et synergiques, et leurs interactions dépendent des composés existants dans les mélanges, de leurs concentrations et du type de test. Il nous est apparu difficile voire impossible de prédire les interactions à partir des composés individuels. Nous n'avons observé aucune trace de métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine ou de la vitisine B dans les cellules RAW 264.7 avec au contraire une accumulation intracellulaire de ces composés. Par contre, dans ces cellules, nous avons mis en évidence pour la première fois le métabolisme du resvératrol en resvératrol-3-O-glucuronide qui présente lui-même des activités anti-inflammatoires et antioxydantes, bien que celles-ci étaient moindre que celles du resvératrol. Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois la formation d'un métabolite actif du resvératrol dans des macrophages. Il a également mis en évidence que les stilbènes de la vigne peuvent interagir de manière additive et/ou synergique contre l'inflammation et le stress antioxydant. Ces interactions nous semblent particulièrement intéressantes dans la mesure où lors du développement de spécialités nutraceutiques, elles permettraient de réduire les doses de composés individuels tout en conservant ou augmentant leur efficacité au sein d'un mélange.

**Mots clés :** Stilbènes, métabolisme, interactions, anti-inflammatoire, antioxydant

---

Unité Mixte de recherche Œnologie – Axe Molécules d'Intérêt Biologique,

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon

## **Vine stilbenes: role of their metabolism and their interactions in anti-inflammatory and antioxidant activities**

Stilbenes are a family of polyphenols that are found, among other things, in vines and wine. Resveratrol, the flagship molecule of this family, is responsible for the formation of numerous derivatives. Resveratrol and its oligomers are known for their anti-inflammatory and antioxidant activities. These activities are partly at the origin of the cardioprotective, antiobesity, anticancer and neuroprotective effects of stilbenes observed *in vivo*, despite a very low bioavailability which is partly explained by significant intestinal and hepatic metabolism that we have shown in the laboratory. This fact suggests that certain stilbene metabolites could be active themselves and participate in the overall activity of these compounds. Generally, the majority of studies focus on the use of stilbenes as individual compounds. However, in our food or in the field of nutraceuticals, these molecules often exist in the form of complex mixtures in extracts and can interact with each other. In doing so, these interactions can either increase or decrease the overall biological activities of the stilbenes within the mixture. Over the last two decades, around a hundred studies have evaluated the interactions between polyphenols from different families. Interactions between stilbenes, however, have only been rarely reported and remain to be determined. The objectives of this thesis work were on the one hand to study the interactions between resveratrol and two of its oligomers, namely  $\epsilon$ -viniferin (a dimer) and vitisin B (a tetramer) then on the other hand to characterize the metabolism of these compounds in order to determine the implications of these phenomena in their anti-inflammatory and antioxidant properties. The interactions were studied in a cell-free model and in a cellular model of rat macrophages (RAW 264.7). Concerning the acellular model, we evaluated the free radical scavenging for individual stilbenes and for their equimolar combinations. Regarding the cellular model, we evaluated the anti-inflammatory and antioxidant activities of individual stilbenes and their combinations in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The metabolism of these stilbenes was measured in RAW 264.7 macrophages stimulated or not by LPS. We showed that stilbenes individually exhibited anti-radical, antioxidant and anti-inflammatory activities and that these effects differentiated from each other depending on the model used. In general, the interactions between stilbenes are additive and synergistic in nature, and their interactions depend on the compounds existing in the mixtures, their concentrations and the type of test. We found it difficult, if not impossible, to predict interactions from individual compounds. We observed no trace of metabolism of  $\epsilon$ -viniferin or vitisin B in RAW 264.7 cells with, on the contrary, an intracellular accumulation of these compounds. On the other hand, in these cells, we demonstrated for the first time the metabolism of resveratrol into resveratrol-3-O-glucuronide which itself presents anti-inflammatory and antioxidant activities, although these were less than those of resveratrol. This work made it possible to demonstrate for the first time the formation of an active metabolite of resveratrol in macrophages. It also demonstrated that vine stilbenes can interact in an additive and/or synergistic manner against inflammation and antioxidant stress. These interactions seem particularly interesting to us to the extent that during the development of nutraceutical specialties, they would make it possible to reduce the doses of individual compounds while maintaining or increasing their effectiveness within a mixture.

**Keywords :** Stilbenes, metabolism, interaction, anti-inflammatory, antioxidant

---

**Unité Mixte de recherche Œnologie – Axe Molécules d’Intérêt Biologique,**

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d’Ornon

# ***REMERCIEMENTS***

## ***Aux membres du jury***

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux. Merci aux deux rapporteurs, le Pr Stéphanie Pain et le Pr Maria Puy Portillo. Merci à l'examineur le Pr Claude Atgié.

## ***A Arnaud Courtois et Stéphanie Krisa***

Je souhaite remercier vivement mon directeur de thèse, le Dr Arnaud Courtois, et ma co-encadrante, le Dr Stéphanie Krisa, pour leur soutien, leur gentillesse, leur conseil scientifique et l'autonomie qu'ils m'ont accordée. Je remercie mon directeur, d'avoir cru en moi pour l'élaboration de cette thèse, pour sa disponibilité et sa bienveillance. Je remercie ma co-encadrante, pour son regard critique et intuitif sur mes questionnements. Je peux réellement dire que j'ai acquis une vision scientifique, un esprit de synthèse et de structuration en prenant exemple sur vous.

## ***Aux membres de l'UMR Œnologie***

Je remercie également, le directeur l'axe MIB, le Pr Tristan Richard pour son accueil, sa bienveillance et son caractère jovial ainsi que les membres de l'axe MIB. Merci pour les moments de convivialités, la bonne humeur, et l'intégration. Grâce à vous Monsieur sucre a réduit sa consommation en sucre.

Je pense particulièrement à Antonio Palos-Pinto, Elodie Renouf, Josep Valls pour leurs précieuses aides et disponibilités. Merci également à tous les autres membres de l'équipe dont Stéphanie Cluzet avec qui j'ai eu le plaisir d'effectuer la mission complémentaire à l'enseignement pendant 2 ans, une expérience riche en apprentissage. Pierre Waffo-Téguo pour ses précieux conseils, Karen Gaudin pour sa bonne humeur, Caroline Rouger, Alain Décendit, Alain Badoc, Grégory Da Costa, et Marie-Laure Iglesias pour sa gentillesse. Une pensée particulière à Eric Pedrot.

Merci aux docteurs, doctorants et post-doctorants : Pauline qui a été là depuis le début de ce projet, Charles, David, Guillaume, Inès, Anthony, Lisa, Benjamin, Adeline, Julie, Julien, Ruth

et Omar. Merci Eva, ah j'oubliais docteur Eva petit, nouvelle maitre de conférence à l'Université de Bordeaux. Merci aux membres du bureau international : Ayoub, Andrew, Patricia, grâce à vous je commence à devenir bilingue en anglais, et à Sara pour les astuces.

Merci à mes stagiaires Nour Attar qui a fourni un travail considérable, Laurine Duarte, Charlotte Da Costa, Emilie Berdeaux et Faiza Laanani dont j'ai eu le plaisir d'encadrer.

Mes remerciements vont également auprès des directeurs de l'UMR Œnologie, le Pr Philippe Darriet et le Pr Patrick Lucas pour leurs accueils.

Je tiens à remercier le Dr Michael Jourdes et Dr Anne-Laure Gance pour nos échanges.

A l'association ADPI, merci pour tous les bons moments.

### *A mes professeurs*

Au cours de mon parcours universitaire, j'ai eu à rencontrer un grand nombre d'enseignants qui ont apporté un plus à mon parcours et donner de l'appétence à la science et à l'enseignement, je pense particulièrement au Pr Michel Hernould, Pr Dominique Rolin, Dr Pierre Pétriacq, Pr Cathérine Bennetau, le Pr Pierre Waffo-Téguo, le Pr Jean-Michel Mérillon et le Dr Anthony Ranchou-Peyruse, vous êtes une source d'inspiration.

### *A mes proches*

Je remercie vivement mes amis. Tout d'abord, Mailys pour son soutien depuis le concours. Ensuite, mes amis Gloire, Vincent, Idrissa, Cissoko, Keita, Sagaye. Une pensée à mes copains rencontrés lors de la formation à l'enseignement « les Cognitivistes » : Pierre, Mathias, Corto et Alice.

Enfin, je souhaite adresser mes plus profonds remerciements à ma famille. Merci à mes parents, frères et sœurs, grands-parents pour leur soutien de près ou de loin. Après avoir quitté mon pays natal il y a 10 ans, je suis fier de pouvoir vous dédier ma réussite. Je pense à mes sœurs Fatou et Alima sans qui je ne serai pas là, à mon frère Jordy. A toi ma grand-mère, Alima Cissé qui nous a quitté, j'aurai aimé que tu puisses voir l'accomplissement de ton petit-fils. Une pensée à toi ma chérie Ophélie, merci pour tout.

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>12</b>
<b>ETAT DE L'ART.....</b>	<b>13</b>
<b>I. GENERALITES SUR LES POLYPHENOLS.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1. Classification des polyphénols.....</b>	<b>14</b>
<b>I.2. Polyphénols dans l'alimentation.....</b>	<b>17</b>
I.2.1. Polyphénols dans l'alimentation : aspect qualitatif.....	17
I.2.2. Polyphénols dans l'alimentation : aspect quantitatif.....	18
I.2.3. Polyphénols dans l'alimentation : consommation journalière.....	20
<b>I.3. Activités biologiques des polyphénols : interactions.....</b>	<b>23</b>
I.3.1. Interactions entre les substances actives.....	23
I.3.2. Interactions des polyphénols vis-à-vis de leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes.....	24
<b>II. LES STILBENES.....</b>	<b>66</b>
<b>II.1. Biosynthèse des stilbènes.....</b>	<b>67</b>
<b>II.2. Sources et apports alimentaires en stilbènes.....</b>	<b>71</b>
II.2.1. Les stilbènes de la vigne.....	72
II.2.2. Les stilbènes dans d'autres plantes que la vigne.....	74
II.2.3. La consommation en stilbènes.....	76
<b>II.3. Activités biologiques des stilbènes.....</b>	<b>77</b>
II.3.1. Activités antioxydantes des stilbènes.....	77
II.3.1.a. Activités antioxydantes des stilbènes in vitro.....	77
II.3.1.b. Activités antioxydantes des stilbènes in vivo.....	79
II.3.1.c. Etudes cliniques sur les activités antioxydantes des stilbènes.....	80
II.3.2. Effets anti-inflammatoires des stilbènes.....	82
II.3.2.a. Effets anti-inflammatoires des stilbènes in vitro.....	82
II.3.2.b. Effets anti-inflammatoires des stilbènes in vivo.....	84
II.3.2.c. Etudes cliniques sur les activités anti-inflammatoires des stilbènes.....	85
<b>II.4. Biodisponibilité de stilbènes.....</b>	<b>86</b>
II.4.1. Absorption et métabolisme du resvératrol.....	86
II.4.2. Absorption et métabolisme de l'ε-viniférine.....	92
<b>OBJECTIF DE LA THESE.....</b>	<b>94</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>97</b>
<b>I. MATERIELS.....</b>	<b>98</b>
<b>I.1. Modèle cellulaire.....</b>	<b>98</b>
<b>I.2. Produits chimiques et réactifs.....</b>	<b>98</b>



<b>II. METHODES .....</b>	<b>98</b>
<b>II.1. Caractérisation et quantification des stilbènes ainsi que de l'extrait .....</b>	<b>98</b>
<b>II.2. Obtention des métabolites du resvératrol.....</b>	<b>99</b>
II.2.1. Production des métabolites du resvératrol par hémisynthèse chimique.....	99
II.2.2. Purification des métabolites du resvératrol par HPLC-sémi-préparative .....	100
<b>II.3. Expérimentations acellulaires .....</b>	<b>102</b>
II.3.1. Test de piégeage DPPH .....	102
II.3.2. Mesure de la réduction du fer ferrique par le test FRAP.....	103
II.3.3. Test de piégeage du monoxyde d'azote .....	104
<b>II.4. Expérimentations cellulaires.....</b>	<b>105</b>
II.4.1. Entretien des cultures cellulaires .....	105
II.4.2. Mesure de la viabilité cellulaire (test MTT).....	105
II.4.3. Mesure de la production de monoxyde d'azote.....	106
II.4.4. Détermination des ROS intracellulaires.....	106
II.4.5. Déterminations des niveaux cellulaires de glutathion.....	107
II.4.6. Dosage du resvératrol dans les cellules RAW 264.7 .....	108
II.4.7. Évaluation des interactions par la méthode des indices de combinaisons (IC).....	108
<b>II.5. Analyses statistiques.....</b>	<b>109</b>
 <b>CHAPITRE I : ETUDE DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DU RESVERATROL, DE L'ε-VINIFERINE ET DE LA VITISINE B SEULES OU EN MELANGE SUR UN SYSTEME ACELLULAIRE.....</b>	<b>110</b>
<b>I. CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DU CHAPITRE I.....</b>	<b>111</b>
<b>II. CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE VIGNE STANDARDISE ENRICHI EN STILBENE.....</b>	<b>112</b>
<b>III. ETUDE DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DE 3 STILBENES AINSI QUE DE LEURS INTERACTIONS POTENTIELLES .....</b>	<b>113</b>
<b>III. 1. Développement et optimisation de la méthode de piégeage du monoxyde d'azote .....</b>	<b>113</b>
<b>III. 2. Etudes des effets antiradicalaires du resvératrol, de l'ε-viniférine et de la vitisine B ainsi que leurs mélanges équimolaires.....</b>	<b>115</b>
<b>IV. DISCUSSION DU CHAPITRE I .....</b>	<b>128</b>
 <b>CHAPITRE II : ETUDE DES ACTIVITES ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTIOXYDANTES DU RESVERATROL, DE L'ε-VINIFERINE ET DE LA VITISINE B ET DES METABOLITES DU RESVERATROL DANS DES MACROPHAGES.....</b>	<b>130</b>
<b>I. CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DU CHAPITRE II.....</b>	<b>131</b>
<b>II. ETUDE DES EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTIOXYDANTS DES STILBENES DANS DES MACROPHAGES ET EVALUATIONS DES INTERACTIONS.....</b>	<b>132</b>

<b>II.1. Etude de la stabilité des trois stilbènes dans les conditions de culture cellulaire .....</b>	<b>132</b>
<b>II.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des macrophages en présence des trois stilbènes et leurs mélanges .....</b>	<b>133</b>
<b>II.3. Évaluation des effets anti-inflammatoires et antioxydants des trois stilbènes et leurs mélanges.....</b>	<b>135</b>
<b>II.4. Évaluation des effets anti-inflammatoires et antioxydants des métabolites du resvératrol .....</b>	<b>140</b>
II.4.1. Effet des métabolites du resvératrol sur la viabilité cellulaire .....	141
II.4.2. Effet des métabolites du resvératrol sur la production du monoxyde d'azote .....	142
II.4.3. Effet des métabolites du resvératrol sur la production des ROS intracellulaires .....	143
<b>III. DISCUSSION DU CHAPITRE 2.....</b>	<b>144</b>
<b>CHAPITRE III : METABOLISME DU RESVERATROL DANS LES MACROPHAGES .....</b>	<b>148</b>
<b>I. CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DU CHAPITRE III.....</b>	<b>149</b>
<b>II. ETUDE DU METABOLISME DU RESVERATROL DANS LES MACROPHAGES EN CULTURE .....</b>	<b>149</b>
<b>II.1. Métabolisme du resvératrol dans les cellules RAW264.7 .....</b>	<b>149</b>
II.1.1. Détermination des métabolites du resvératrol produits par les cellules RAW264.7 .....	149
II.1.2. Métabolisme du resvératrol par les cellules RAW264.7 en fonction du temps .....	150
<b>II.2. Mécanismes impliqués dans le métabolisme du resvératrol dans les macrophages.....</b>	<b>154</b>
<b>II. 3. Conclusion du chapitre 3.....</b>	<b>155</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>157</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>164</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>165</b>

## *Abréviations*

BSA	Sérum-albumine bovine
DMEM	milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPPH	1,1-diphényl-2-pycryhydrazyl
FBS	Sérum de veau foetal
FRAP	Pouvoir antioxydant ferricréducteur
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IC	Indice de combinaison
IRD	Indice de réduction de dose
LPS	Lipopolysaccharides
MDA	Malondialdéhyde
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium
NO	Monoxyde d'azote
PBS	Tampon phosphate salin
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
SSVE	Extrait de vigne standardisé enrichi en stilbène
SNP	Nitroprussiate de sodium
R3G	Resvératrol-3- <i>O</i> -glucuronide
R4'G	Resvératrol-4'- <i>O</i> -glucuronide
R3S	Resvératrol-3- <i>O</i> -sulfate
RSV	Resvératrol
VNF	Viniférine
VB	Vitisine B
UHPLC-DAD-MS	Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la détection par barrette de diodes et à la spectrométrie de masse

## Liste des figures

Figure 1: Structure des différentes classes de polyphénols. ....	16
Figure 2: Représentation hypothétique du synergisme, de l'additivité et de l'antagonisme. ....	24
Figure 3: Principales structures des stilbénoides, modifiée de Rivière et al. (2012). ....	66
Figure 4: Voie de biosynthèse des stilbènes. ....	67
Figure 5: Principales substitutions du resvératrol, donnant différents monomères. ....	68
Figure 6: Mécanismes hypothétiques de la dimérisation du resvératrol menant à la formation de l' $\epsilon$ -viniférine (d'après Keylor et al., 2015, modifié). ....	69
Figure 7: Exemples de structures des oligomères du resvératrol. ....	71
Figure 8: Principaux métabolites issus du métabolisme de phase I, II et du microbiote intestinal. ....	88
Figure 9: Représentation schématique de la transformation, distribution et excrétion du resvératrol à travers le tractus gastro-intestinal humain, d'après Springer et al. (2019) ....	89
Figure 10: Démarche expérimentale de la thèse ....	96
Figure 11: Chromatogramme de l'extrait de vigne standardisé enrichi en stilbène. ....	112
Figure 12: Mécanisme de la photodégradation du nitroprussiate (d'après William et al., 1984, modifié). ....	113
Figure 13: Optimisation des paramètres utilisés dans la méthode de piégeage du NO. ....	115
Figure 14: Stabilité des stilbènes dans le milieu de culture. ....	132
Figure 15: Viabilité des macrophages en présence du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B. ....	134
Figure 16: Effet du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B et leurs mélanges équimolaires sur l'inhibition de la production du NO de manière dose-dépendante. ....	136
Figure 17: Effet du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B et leurs mélanges équimolaires sur l'inhibition des ROS intracellulaires de manière dose-dépendante. ....	138
Figure 18: Effet du resvératrol sur la synthèse du glutathion. ....	140
Figure 19: Viabilité des macrophages en présence du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G. ....	141
Figure 20: Effet du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G sur l'inhibition du NO de manière dose-dépendante. ....	142
Figure 21: Effet du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G sur l'inhibition des ROS intracellulaires de manière dose-dépendante. ....	143
Figure 22 : Profil UHPLC-DAD et quantification du resvératrol et du resvératrol-3-O-glucuronide. ....	150
Figure 23: Profil UHPLC-DAD du resvératrol et du R3G et cinétique d'apparition du R3G. ....	151
Figure 24: Cinétiques de formation de R3G, mettant en évidence la différence entre les cellules contrôles et les cellules traitées au LPS. ....	153
Figure 25: Déglucuronidation de R3G dans les cellules contrôle et traitées au LPS. ....	154

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Exemple d'aliments contenant des polyphénols en quantité importante par portion consommée (Perez-Jimenez et al., 2010, Pinto et Santos, 2017, Phenol-Explorer).....	20
<b>Tableau 2:</b> Profil de l'apport alimentaire en composés phénoliques dans certains pays du monde. ....	22
<b>Tableau 3:</b> Quantification des stilbènes dans les vins rouges.....	73
<b>Tableau 4:</b> Teneur et composition des stilbènes dans différentes espèces végétales d'après Dubrovina et al., 2017, modifié). .....	75
<b>Tableau 5:</b> Résumé de quelques études évaluant les activités antioxydantes des stilbènes. ....	78
<b>Tableau 6:</b> Résumé de quelques études évaluant les activités anti-inflammatoires des stilbènes. ....	82
<b>Tableau 7:</b> Quantification et caractérisation de l'extrait selon Biais et al. (2017).....	99
<b>Tableau 8:</b> Etude comparative des différents paramètres utilisés dans la méthode de piégeage du NO .....	114
<b>Tableau 9:</b> Valeurs IC50, IC et DRI des combinaisons équimolaires de stilbènes lors de l'inhibition du NO .....	137
<b>Tableau 10:</b> Valeurs IC50, IC et IRD des combinaisons équimolaires de stilbènes lors de l'inhibition des ROS intracellulaires .....	139

## **ETAT DE L'ART**

## I. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, également appelés métabolites spécialisés, présents chez les plantes, les algues et les champignons. Dépourvus de tout groupement fonctionnel azoté, les polyphénols sont constitués d'au moins un cycle phénolique/aromatique (Quideau et al., 2011). Ces cycles phénoliques sont issus de deux voies métaboliques, l'une faisant intervenir l'acide shikimique (voie shikimate), l'autre faisant intervenir l'acide acétique (voie polyacétate ou des polycétides). Les polyphénols, constituent l'un des groupes de molécules les plus abondants chez les végétaux, avec plus de 8000 composés connus, allant de molécules simples comme les acides phénoliques jusqu'à des molécules hautement polymérisées comme les tanins (Bravo, 1998; Tsao, 2010).

### I.1. Classification des polyphénols

Selon leur structure chimique et leur complexité, les polyphénols sont généralement classés en deux groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Figure 1).

Plus particulièrement, les **flavonoïdes**, groupe de composés phénoliques le plus abondant, sont subdivisés en 6 sous-groupes à savoir : flavonols, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanes et isoflavones. Structuellement, ils sont caractérisés par un squelette C6-C3-C6 correspondant à deux noyaux aromatiques liés par trois carbones formant un pont hétérocyclique oxygéné (Rudrapal et al., 2022).

- Les **flavanols** présentent la particularité d'avoir un squelette 3,3',4,5,7-pentahydroxyflavone. Présents dans les aliments, on les retrouve principalement sous forme de monomères ( (+)-catéchine et (-)-épicatéchine), de dérivés hydroxylés ((-)-gallocatéchine et (-)-épigallocatéchine), ou d'esters de l'acide gallique ((-)-épigallocatéchine gallate ou (-)epicatechine gallate) (Vong et al., 2022).
- Les **flavanones** sont des flavonoïdes ayant une fonction cétone sur leur hétérocycle. Les molécules les plus étudiées de ce groupe sont la naringénine et l'hespérétine (Durazzo et al., 2019)
- Les **flavonols** présentent un squelette caractéristique des 3-hydroxyflavones que l'on trouve principalement dans les plantes sous forme de glycosides. La quercétine, la myricétine et le kaempférol sont les principaux représentants de ce sous-groupe (Vong et al., 2022).

- Les **flavones** présentent une structure chimique singulière basée sur celle de la flavone (2-phényl-1-benzopyran-4-one). La lutéoline et l'apigénine sont les principales flavones trouvées dans les aliments (Durazzo et al., 2019).
- Les **isoflavones** sont des isomères de flavones ayant un groupe phényle attaché au carbone 3 de l'hétérocycle. Ils sont souvent appelés phyto-œstrogènes en raison de leur structure, de leur taille et de leurs propriétés œstrogéniques similaires à celles des œstrogènes. Les composés les plus connus sont la génistéine, la daidzéine, la biochanine A et la glycitéine. Ils sont présents presque exclusivement dans les légumineuses (Durazzo et al., 2019; Muratori et al., 2022).
- Les **anthocyanes** constituent le groupe de pigments végétaux solubles dans l'eau le plus important et sont responsables de la couleur des fruits et des fleurs variant du rouge-orange au bleu-violet. Les unités structurales de base des anthocyanes sont les anthocyanidines, qui sont ensuite présentes sous forme glucosides, acylés ou coumaroylés. Les anthocyanidines les plus courantes sont la malvidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine, la pétunidine et la pélargonidine (Durazzo et al., 2019; Kardum & Glibetic, 2018).

Concernant les non-flavonoïdes, ils sont quant à eux classés en acides phénoliques, lignanes et stilbènes (Hollman et al., 2011).

- Les **acides phénoliques**, structurellement caractérisés par un groupe carboxyle lié à un noyau benzénique, sont les non-flavonoïdes les plus abondants. Ces composés existent généralement dans les végétaux sous forme libre ou estérifiée et sont subdivisés en acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) comprennent les acides gallique, ellagique, *p*-hydroxybenzoïque, syringique et protocatéchique. Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) comprennent les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide *p*-coumarique est le principal précurseur dans la synthèse des acides phénoliques tels que les acides caféique, chlorogénique, rosmarinique et férulique (Rudrapal et al., 2022; Muratori et al., 2022). Certains acides hydroxycinnamiques peuvent être trouvés sous des formes estérifiées comme l'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique et de l'acide quinique).
- Les **stilbènes**, sont des polyphénols caractérisés par un squelette C6-C2-C6. Ce sont des molécules qui présentent une grande diversité structurale dont le resvératrol est l'unité de base. Ce dernier, est le composé le plus connu et le plus étudié dans le groupe des stilbènes (Rivière et al., 2012; Shen et al., 2009).



- **Les lignanes** constituent une classe moins abondante de composés phénoliques structurellement caractérisés par un squelette dibenzylbutane. Les principaux lignanes sont la silymarine, le pinosésinol, le syringésinol, sésamine, sésamoline (Rudrapal et al., 2022 ; Durazzo et al., 2019).

Au sein de deux groupes constitués par les flavonoïdes et les non-flavonoïdes, on retrouve le groupe des tanins. Ceux-ci présentent des poids moléculaires intermédiaires à élevés et sont fortement hydroxylés, conduisant à la possible formation de complexes insolubles avec les hydrates de carbones et les protéines. Cette propriété est responsable de l'astringence des aliments riches en tanins. Les tanins sont divisés en tanins hydrolysables et tanins condensés. Les tanins hydrolysables, et plus particulièrement les gallotannins et les ellagitanins, sont issus de la polymérisation de l'acide gallique et ellagique présents dans la famille des non-flavonoïdes. Les tanins condensés sont issus de la polymérisation de monomères de flavanols, sous-groupe constitutif des flavonoïdes (Bravo, 1998; Durazzo et al., 2019).

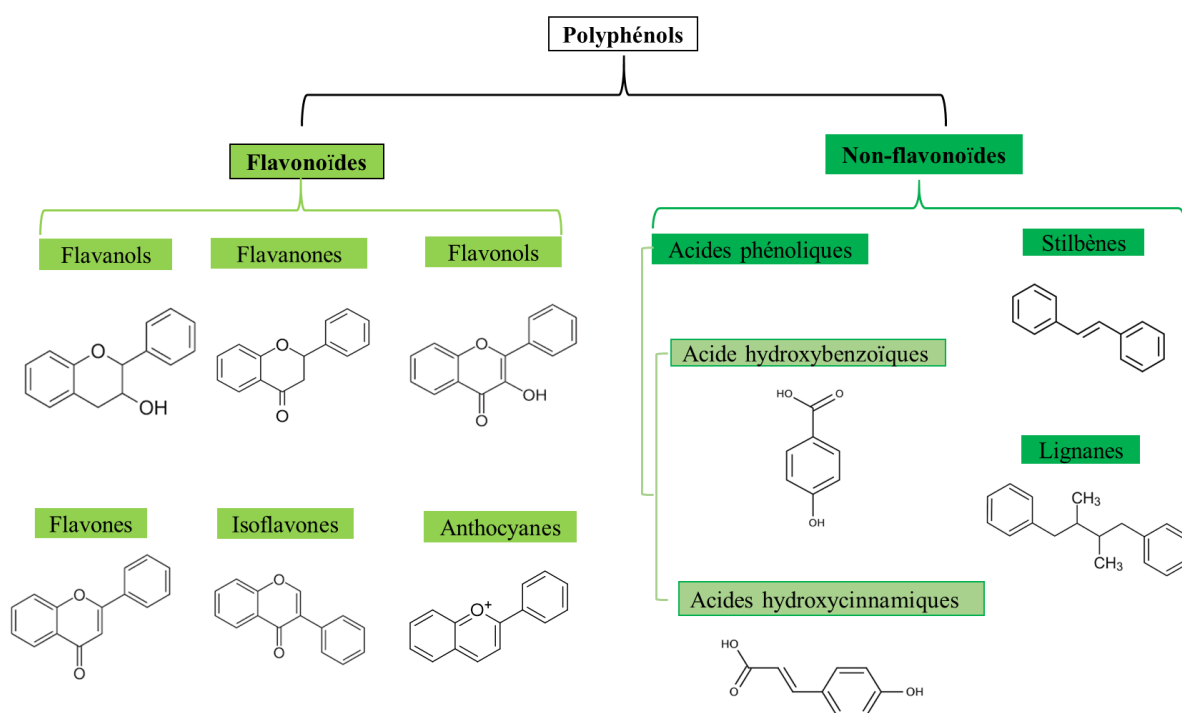


Figure 1: Structure des différentes classes de polyphénols.

## **I.2. Polyphénols dans l'alimentation**

Les polyphénols sont dans les aliments d'origine végétale. En effet, plus de 500 polyphénols sont présents dans les fruits, les légumes, les légumineuses et les céréales de notre alimentation ainsi que dans leurs produits dérivés (Neveu et al., 2010). Les polyphénols sont en partie responsables des propriétés sensorielles (astringence, amertume, arôme et couleur) des aliments et des boissons d'origine végétale (Bravo et al., 1998).

La teneur et le profil en polyphénols dans les aliments sont influencés par de nombreux facteurs : variété ou cultivar de plante, le climat (exposition au soleil, précipitations) et l'agronomie, l'état de maturité à la récolte, la manutention post-récolte, le stockage et enfin la transformation des aliments (Hollman et al., 2011).

### **I.2.1. Polyphénols dans l'alimentation : aspect qualitatif**

Plusieurs revues ont décrit la composition en polyphénols des aliments (Bravo, 1998; Hollman et al., 2011; Scalbert & Williamson, 2000). Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants et représentent environ les deux tiers des polyphénols alimentaires (Robbins, 2003). Parmi les flavonoïdes, la quercétine est le composé le plus fréquent de notre alimentation, se retrouvant dans de nombreux fruits et légumes ainsi que leurs produits dérivés (Hertog and Hollman, 1993). Sa consommation est estimée entre 12,6 et 49,9 mg/jour (Nishimuro et al., 2015). Certains polyphénols sont en revanche spécifiques d'aliments particuliers, comme les flavanones dans les agrumes (Cione et al., 2020) ou les isoflavones dans le soja (Reinli & Block, 1996). Les flavanols, avec notamment les catéchines, sont très abondants dans le thé et le cacao. L'épigallocatechine gallate est le composé polyphénolique le plus abondant dans le thé vert, représentant 65 % de la teneur totale en catéchines (Muratori et al., 2022). Les anthocyanes qui sont des pigments, sont présents dans les fruits rouges tels que les raisins rouges, cerises, fraises, framboises, mûres, les groseilles et les cassis ainsi que tous leurs produits dérivés (Scalbert et al., 2000).

Les acides phénoliques sont très abondants dans les aliments. Parmi eux, l'acide caféique qui est le plus fréquemment rencontré se trouve également sous forme d'esters comme l'acide chlorogénique, qui est le principal constituant phénolique du café (Scalbert et al., 2000). Une tasse de café (200 ml) contient 50 à 150 mg d'acide chlorogénique (Clifford, 1999). Cette molécule est également présente dans de nombreux fruits et légumes.

Certains aliments contiennent plusieurs sous-classes de composés phénoliques comme les acides phénoliques, les stilbènes, les anthocyanes, les tanins et d'autres flavonoïdes, le vin en est un exemple (Bravo, 1998)

### I.2.2. Polyphénols dans l'alimentation : aspect quantitatif

Il existe une abondante littérature sur le contenu et la teneur en polyphénols dans les aliments et les boissons d'origine végétale (Neveu et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2010; Pinto & Santos, 2017). Généralement, deux approches sont utilisées pour déterminer la teneur en polyphénols des aliments, à savoir, le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui mesure la teneur en antioxydant total (composés phénoliques et non-phénoliques) et les techniques chromatographiques, utilisées pour identifier et quantifier les composés ainsi séparés (Pinto & Santos, 2017). Les différentes teneurs publiées sont alors répertoriées dans des bases de données. Les deux principales sont la base de données américaines du Département de l'agriculture des États-Unis (USDA) et la base de données Européenne Phenol-Explorer qui est la plus importante et la plus utilisée car plus complète (Chiva-Blanch & Badimon, 2017). La base de données Phenol-Explorer rassemble des informations sur toutes les classes (6 classes), sous classes (31 sous-classes) et tous les types de polyphénols (501 glycosides, esters et aglycones de polyphénols), y compris leurs métabolites contenus dans 459 aliments (Pérez-Jiménez et al., 2010).

L'évaluation de l'apport quotidien en composés phénoliques chez l'homme se fait à l'aide de 2 types de données : (1) les données extraites de questionnaires de fréquence alimentaire (FFQ) qui fournissent les données sur les aliments d'origine végétale consommés et (2) les teneurs en polyphénols des aliments selon les bases de données citées précédemment. En se référant à l'outil Phenol-Explorer, Pérez-Jiménez et al. (2010) ont identifié les 100 aliments les plus riches en polyphénols. Ils ont conclu que les assaisonnements (comprenant les épices et les herbes aromatiques) comme les clous de girofle (15 188 mg/100 g), la menthe poivrée (11 960 mg/100 g), l'anis étoilé (5460 mg/100 g), figuraient en tête des aliments les plus riches en polyphénols, suivis par les produits à base de cacao (poudre de cacao et le chocolat), les fruits (essentiellement les baies de couleur foncée : l'airelle noire, le sureau noir, la myrtille et le cassis mais aussi la prune, la cerise et la mûre), les graines (la graine de lin, la châtaigne et la noix, la noisette, la noix de pécan, le soja), les légumes (olives noires et vertes, les têtes d'artichaut, les chicorées rouges et vertes, l'oignon (rouge ou jaune), l'échalote et les épinards), les boissons non alcoolisées (le café, suivi du thé noir et du thé vert), les céréales (farines complètes de blé

ou de seigle), les boissons alcoolisées (le vin rouge) et les huiles (l'huile d'olive extra-vierge et l'huile de colza). Les teneurs totales en polyphénols sont comprises entre 15 188 mg/100 g mg/100 g pour les clous de girofle et 7,8 mg/100 ml pour le vin rosé (Perez-Jimenez et al., 2010).

Ces différentes teneurs montrent donc que les aliments peuvent être plus ou moins riches en polyphénols d'un point de vue quantitatif. Cependant, les épices et les herbes bien que très riches en polyphénols sont peu consommés en termes de quantité, alors que certains fruits comme les oranges et les pommes ont une quantité modérée en polyphénols mais sont consommés de façon plus fréquente. Par conséquent, la notion de « portion d'aliment consommé » doit être prise en compte dans l'estimation de la consommation en polyphénols. Perez-Jimenez et al. (2010) ainsi que Pinto et Santos. (2017) ont donc classé les aliments riches en polyphénols en prenant en compte la taille de la portion consommée. Ainsi, les fruits sont identifiés comme le groupe d'aliments apportant la quantité la plus importante en polyphénols, suivi des légumes, les produits céréaliers, les graines et produits apparentés, les épices et les herbes (Perez-Jimenez et al., 2010; Pinto et Santos, 2017). Ces aliments sont présentés dans le tableau 1. Certains aliments sont particulièrement riches en polyphénols ou classe de polyphénols spécifiques comme décrit par Bravo et al. (1998) et Hollman et al. (2011). Par exemple, les fruits rouges comme les baies, les jus de fruits rouges et les vins rouges se caractérisent par une teneur élevée en anthocyanes, tandis que les fruits tels que les pommes et les agrumes sont riches en acides phénoliques et en flavanones, respectivement. Les légumineuses comme le soja sont riches en isoflavones. Les boissons comme le café sont riches en acides phénoliques, le thé en catéchines, le cacao en flavan-3-ols et en proanthocyanidines. De plus, il faut noter que certains aliments contiennent un composé phénolique majoritaire comme l'épigallocatechine gallate dans le thé ou les acides chlorogéniques dans le café. Cependant, d'autres aliments comme le vin contiennent un mélange complexe de classes de composés phénoliques comme les flavonoïdes, les acides phénoliques, stilbènes, les hydroxybenzaldehydes et les tyrosols.

**Tableau 1:** Exemple d'aliments contenant des polyphénols en quantité importante par portion consommée (Perez-Jimenez et al., 2010, Pinto et Santos, 2017, Phenol-Explorer).

Groupe alimentaire	Aliments et familles de polyphénols dominants
Fruits	Baies (Aronia : anthocyanes, flavols, acides hydroxycinnamiques ; Sureau : anthocyanes, flavonols ; Cassis : anthocyanes, flavanols flavonols, acides phénoliques) Pommes (anthocyanes, dihydrochalcones, flavanols, flavonols, acides phénoliques) Oranges (flavanones)
Légumes	Artichaud (flavones, acides hydroxycinnamiques) Oignon (flavonols, acides phénoliques) Broccoli (flavonols, acides hydroxycinnamiques) Olives (flavone, acides phénoliques, tyrosols, 3,4-Dihydroxyphénylglycol)
Boissons non alcoolisées	Café (acide hydroxycinnamique, Thé vert (flavanols)
Légumineuses	Haricots communs entier (flavanols, flavonols, isoflavones) Soja (isoflavones)
Graines et produits apparentés	Poudre de cacao (flavanols, acides phénoliques) Chocolat noir (flavanols, flavonols, acides phénoliques, stilbènes)
Vin	Rouge (anthocyanes, flavanols, flavonols, flavanones, acides phénoliques, stilbènes, hydroxybenzaldehydes, tyrosols)
Epices et herbes	Clous de girofle (flavonols, acides phénoliques, hydroxyphénylpropènes) Câpres (flavonols) Origan (acides phénoliques)

### I.2.3. Polyphénols dans l'alimentation : consommation journalière

Plusieurs revues décrivent l'apport alimentaire en polyphénols chez l'Homme (Castro-Barquero et al., 2018; Chiva-Blanch & Badimon, 2017; Issaoui et al., 2020). Les auteurs soulignent la difficulté de ce type d'étude du fait d'une grande diversité des méthodes utilisées (méthodes analytiques des polyphénols (dosage Folin-Ciocalteu ou chromatographique) méthodes d'évaluations des apports alimentaires, utilisation de bases de données). Cinq études vous seront présentées dans ce manuscrit.

En 2011, Perez-Jimenez et al. (2011) a évalué l'apport alimentaire des polyphénols chez 4942 adultes français de la cohorte SUPplémentation en VItamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX) par des enregistrements alimentaires sur 24h et en rapportant ces infos à la base de données Phenol-Explorer afin de calculer les apports. Les auteurs ont estimé l'apport moyen total en polyphénols à  $1193 \pm 510$  mg/jour, les esters d'acide hydroxycinnamique étant la sous classe de polyphénols la plus consommée ( $599 \pm 426$  mg/jour) suivis des proanthocyanidines ( $227 \pm 162$  mg/jour). Les principales sources alimentaires sont les boissons non alcoolisées

(café et thé) qui fournissent plus de la moitié ( $658 \pm 426$  mg/jour) des polyphénols, suivies des fruits qui apportent  $206 \pm 151$  mg/jour (dont les pommes représentant 45% des polyphénols de fruits), du vin rouge, des produits à base de cacao, des légumes et des céréales. D'une manière générale, le café s'est avéré être le principal contributeur de polyphénols dans l'alimentation des adultes français, représentant 44 % des apports (Pérez-Jiménez et al., 2011).

Une étude s'intéressant aux habitudes nutritionnelles caractérisant le mode de vie méditerranéen, a été réalisée à Catane en Italie sur la cohorte baptisée Mediterranean Healthy Eating, Aging, and Lifestyle study (MEAL). L'étude a estimé l'apport alimentaire et les principales sources alimentaires de polyphénols à travers un FFQ et la base de données Phenol-Explorer (Godos et al., 2017). L'apport moyen en polyphénols des 1937 individus adultes était de 663,7 mg/jour, dont les principaux apports par sous-classe étaient les acides phénoliques (362,7 mg/jour) suivi des flavonoïdes (258,7 mg/jour). Les principales sources alimentaires de polyphénols totaux sont très variées, les noix représentent la principale source, suivies par les boissons non alcoolisées dont le thé et du café, les fruits (les cerises et les agrumes) et les légumes (artichauts, olives, épinards et haricots), puis le chocolat, le vin rouge et les pâtes.

En 2013, l'étude "PREvencion con DIeta MEDiterranea" (PREDIMED) estimait les niveaux d'apport de polyphénols et les principales sources alimentaires correspondantes sur une population de 7200 espagnols à l'aide de registres individuels de consommation alimentaire. Les auteurs ont estimé l'apport moyen total en polyphénols à  $820 \pm 323$  mg/jour. Cet apport était composé de  $443 \pm 218$  mg/jour de flavonoïdes,  $304 \pm 156$  mg/jour d'acides phénoliques et 73 mg/jour de composés phénoliques d'autres groupes. Les fruits étaient la principale source alimentaire ( $360 \pm 217$  mg/jour), suivies des boissons non alcoolisées (principalement le café) ( $192 \pm 140$ ), des légumes ( $104 \pm 40$  mg/jour), des boissons alcoolisées ( $67 \pm 126$  mg/jour), des céréales ( $43 \pm 48$  mg/jour), des huiles (principalement l'huile d'olive), des produits à base de cacao, des noix et des graines, ainsi que des légumineuses qui apportaient 53,6 mg/jour de polyphénols totaux dans l'alimentation. Le facteur déterminant de l'alimentation espagnol par rapport aux autres pays était la consommation de polyphénols issus des olives et de l'huile d'olive (Tresserra-Rimbau et al., 2013).

Une étude réalisée en Pologne dans la cohorte baptisée Health, Alcohol and Psychosocial Factors In Eastern Europe "HAPIEE" s'est intéressée à l'apport nutritionnel en polyphénols de 10477 adultes de 45 à 69 ans à travers les FFQ et la base de données Phenol-Explorer. L'apport moyen de polyphénols de cette population était estimé à  $1756,5 \pm 695,8$  mg/jour, et les flavonoïdes et les acides phénoliques étaient les classes majoritaires avec respectivement 897 mg/jour et 800 mg/jour. Les principaux aliments contributeurs étaient les boissons non

alcoolisées comme le café (40%), le thé (27%) et le chocolat (8%). Les fruits et légumes contribuaient de façon minoritaire dans les apports en polyphénols du régime alimentaire polonais (Grosso et al., 2014).

Une étude de Taguchi (2015) décrivait l'apport en sous-classes de polyphénols et les principales sources alimentaires chez 610 sujets Japonais âgés en utilisant les FFQ et la base de données Phenol-Explorer. Les auteurs estimaient un apport moyen total en polyphénols de  $1492 \pm 665$  mg/jour, dont les principaux aliments contribuant aux apports en polyphénols étaient représentés par les boissons non alcoolisées (79,1 %) dont le café et le thé vert qui représentaient respectivement 43,2 % et 26,6 % des polyphénols totaux (Taguchi et al., 2015).

Le tableau 2 résume les études susmentionnées. Dans l'ensemble, ces études sur l'apport en polyphénols par l'alimentation suggèrent une grande variabilité de la consommation de polyphénols entre les différents pays. Cette hétérogénéité de l'apport alimentaire en polyphénols a pour origine la différence des sources alimentaires en fonction de pays. De plus, le manque de méthodes analytiques standardisées et la variation de la teneur dans un aliment particulier pourraient significativement modifier les valeurs des apports alimentaires. Cependant, bien que les valeurs présentées ne soient pas directement comparables, elles révèlent l'importance du café et du thé comme source de polyphénols.

**Tableau 2:** Profil de l'apport alimentaire en composés phénoliques dans certains pays du monde.

Pays	Nombre de sujet	Apports journaliers (mg/jour)	Composés majoritaires	Principales sources	Référence
France	4942	$1193 \pm 510$	Esters d'acide hydroxycinnamique et proanthocyanidines	Boissons non alcoolisées et fruits	(Perez-Jimenez et al., 2011)
Espagne	7200	$820 \pm 323$	Acides hydroxycinnamiques	Fruits, boissons non alcoolisées, légumes, céréales, huiles, produits à base de cacao, noix et graines	(Tresserra-Rimbau et al., 2013)
Italie	1937	663,7	Acides phénoliques et flavonoïdes	Noix, thé, café, fruits, légumes, chocolat et vin	(Godos et al., 2017)
Pologne	10477	$1756,5 \pm 695,8$	Flavonoïdes et acides phénoliques.	Café, thé et chocolat	(Grosso et al., 2014)
Japan	610	$1492 \pm 665$	n.d.	Boissons non alcoolisées : café et thé vert	(Taguchi et al., 2015)

n.d. : non déterminé

### **I.3. Activités biologiques des polyphénols : interactions**

L'alimentation est une composante déterminante dans la prévention de nombreuses maladies chroniques qui représentent environ 86 % des décès en Europe. Depuis plus de 20 ans, différentes études épidémiologiques suggèrent qu'une consommation d'aliments (fruits et légumes) ou de boissons riches en polyphénols serait capable de prévenir la survenue de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, maladies dégénératives, maladies métaboliques, ...). Ces pathologies ont en commun un stress oxydant et une inflammation chronique dans leur processus physiopathologiques (Durazzo et al., 2019; Reinisalo et al., 2015; Scalbert & Williamson, 2000).

De façon concomitante, de nombreux travaux ont mis en évidence les effets biologiques des polyphénols aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* (en pré-clinique et clinique). Depuis 2013, plus de 200 revues et plus de 700 articles sont référencés sur PubMed chaque année avec les mots-clefs « polyphénols » et « santé ». Dans la grande majorité des cas, les études sont réalisées sur les activités biologiques de polyphénols purs (retrouvés dans l'alimentation ou non). Cependant, dans le contexte de l'alimentation ou des nutraceutiques, il semble important de prendre en considération l'ensemble des polyphénols présents.

#### **I.3.1. Interactions entre les substances actives**

Dans les plantes et leurs extraits, les substances actives, tels que les polyphénols, sont généralement présents sous forme de mélanges complexes. Ces différents composés peuvent alors interagir entre eux. De ce fait, l'effet biologique ne peut pas être attribué à un seul composé mais plutôt aux interactions de mélanges complexes de molécules (Bernal-Mercado et al., 2018; Habza-Kowalska et al., 2021; Kurin et al., 2012). Par conséquent, il est important d'évaluer les effets de la combinaison de ces molécules.

Trois types d'interactions sont admis dans la littérature : les interactions synergiques, additives et antagonistes. La synergie vient du mot grec "synergos", qui signifie "travailler ensemble". Ainsi, il y a synergisme lorsque l'effet combiné de deux molécules est supérieur à la somme des effets attendus des deux molécules individuelles ( $1+1 > 2$ ), antagonisme lorsque l'effet combiné de deux molécules est inférieur à la somme des effets des deux molécules individuelles ( $1+1 < 2$ ), et additivité lorsque la combinaison de deux molécules donne un effet identique à la somme des effets des deux molécules individuelles ( $1+1 = 2$ ) (Figure 2) (Bernal-Mercado et al., 2018; Bijnsdorp et al., 2011). Cependant, en raison de la complexité du système biologique



de la cellule entière, l'évaluation des interactions n'est pas aussi simple que celle décrite par ces calculs (Bijnsdorp et al., 2011; Pezzani et al., 2019).

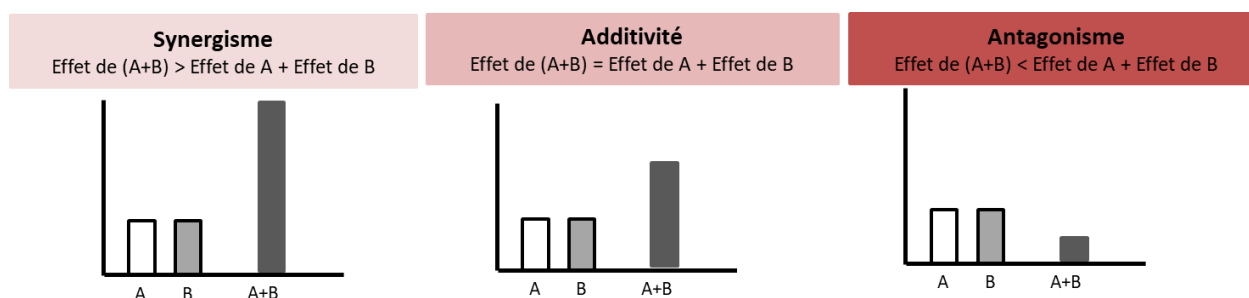


Figure 2: Représentation hypothétique du synergisme, de l'additivité et de l'antagonisme.

Ainsi, bien que chaque polyphénol individuel puisse exercer un effet biologique, il est probable que l'effet du mélange de composés soit plus important que les effets individuels. Ces effets synergiques/additifs des composés bioactifs tels que les polyphénols des aliments pourraient expliquer les effets bénéfiques d'aliment riches en polyphénols (Durak et al., 2014; Iacopini et al., 2008; Kurin et al., 2012; Vivancos & Moreno, 2008).

### I.3.2. Interactions des polyphénols vis-à-vis de leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes

Les polyphénols étant connus pour leurs activités anti-inflammatoires et antioxydantes, leurs utilisations pourraient être un moyen d'atténuer l'inflammation et le stress oxydant, et par conséquent de prévenir les maladies chroniques associées. Une augmentation du nombre de publications scientifiques sur les « interactions entre les polyphénols » est apparue ces deux dernières décennies.

Nous avons synthétisé les résultats de ces études sous la forme d'une revue de la littérature qui est présentée dans la suite de ce document. Cette revue est organisée de la manière suivante :

- description des processus de l'inflammation et du stress oxydant,
- description des études réalisées in vitro au niveau acellulaire ou cellulaire,
- description des études réalisées in vivo chez l'animal ou chez l'Homme

# **Polyphenols in food: A comprehensive review of their interactions in anti-inflammatory and antioxidant activities**

Biranty Sy, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, Arnaud Courtois

## **I. Introduction**

### **1 Inflammation**

Inflammation is a body's organized response for the protection against an aggression (injury, infection by pathogens, exposure to chemical substances). Blood vessels, cellular mediators (mast cells, monocytes, macrophages, lymphocytes) and molecular mediators (cytokines) are involved in this protective response, which restores homeostasis to injured tissues [1]. The aim of inflammation is to limit and eliminate the causes of cellular damage, remove and/or absorb necrotic cells and tissues, and then initiate tissue repair [2]. However, when this response is prolonged, it can evolve into what is termed chronic inflammation, which can cause more damage to the host than to the pathogen itself and be the cause of chronic pathologies [3].

A well-known mechanism for triggering an inflammatory response is the stimulation of macrophages by lipopolysaccharide (LPS, a sugar found in the membrane of Gram-negative bacteria). Two signalling pathways exist, one involving the TRIF protein (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) and the other involving the myeloid differentiation factor (MyD88). By binding to Toll like receptor 4 (TLR4), expressed on the surface of the macrophage membrane, LPS activates myeloid differentiation factor (Myd88). Myd88 then leads to activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B via degradation of I $\kappa$ B, an inhibitory protein linked to this transcription factor. Activation of NF- $\kappa$ B in fine leads to its translocation to the nucleus where it will trigger the transcription of numerous pro-inflammatory players such as cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) or pro-inflammatory enzymes (iNOS, COX-2) [2,4,5].

In addition to the NF- $\kappa$ B pathway, LPS also activates the classical intracellular MAPK signaling pathways, which comprise three main members: extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38 kinases (p38 MAPKs) and c-Jun N-terminal kinases (JNKs). Once activated, these pathways either regulate the production and release of pro-inflammatory mediators and modulate HO-1 expression [6], or in turn activate various transcription factors including NF- $\kappa$ B (p50/p65) and activator protein 1 (c-FOS/c-JUN) [7].

## 2. Oxidative stress

Oxidative stress is a condition that arises when the body's antioxidant defense systems lose their ability to respond to and neutralize reactive oxygen species whose excess generation causes redox imbalance. This excess of reactive species is capable of damaging cellular components such as DNA/RNA, proteins and lipids, potentially leading to cell death or contributing to the development of disease. Oxidative Stress is generated by the production of reactive species derived from oxygen (ROS) or nitrogen (RNS), such as superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radicals (OH $\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hypochlorous acid (HClO), nitric oxide (NO), or peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ) [7–9].

Superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), one of the main reactive oxygen species, is constantly generated either by the mitochondrial respiratory chain during electron transport, or by other endogenous reactions, such as those involving lipoxygenases, cyclooxygenases, xanthine oxidases, NADPH oxidases or even NO synthases when the latter operate in uncoupled mode. Once formed,  $O_2^{\cdot-}$  in turn generates other oxidizing agents, such as  $H_2O_2$ , OH $\cdot$ , ONOO $\cdot$  by various mechanisms [7,8]. For example,  $O_2^{\cdot-}$  is converted to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and molecular oxygen ( $O_2$ ) by superoxide dismutase (SOD). The  $H_2O_2$  formed could be converted to  $H_2O$  and  $O_2$  by catalase (CAT) in lysosomes or by glutathione peroxidase (GPx) in mitochondria [10,11].  $H_2O_2$ , via the metal-catalyzed Fenton reaction, can also be converted to OH $\cdot$  [12]. By combining with nitric oxide (NO),  $O_2^{\cdot-}$  also produces another highly reactive compound, peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ) [12]. Peroxynitrite can then in turn also produce the  $\cdot$ OH radical.

In order to limit the deleterious effects of oxygen- or nitrogen-derived radical species, several endogenous defense systems exist. These include enzymatic antioxidant systems, controlled by transcription factors, and non-enzymatic systems. Nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2) is the main transcription factor regulating redox homeostasis, controlling the expression of over 1,000 genes in the cell under normal and oxidative stress conditions [13]. Under normal physiological conditions, the transcription factor Nrf2 is inactive in the cytoplasm due to its binding to the inhibitory protein Keap1. However, under oxidative stress or in the presence of certain inducers, Nrf2 is released from Keap1 and translocated to the nucleus, where it binds with antioxidant response elements (AREs) to regulate the expression of antioxidant enzymes such as NAD(P)H/Quinone oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), or glutathione peroxidase (GPx) [13–17]. The main function of antioxidant enzymes is to neutralize the free radicals generated by oxidative stress. HO-1, one of the most important

antioxidant enzymes regulated by NRF2, is an inducible enzyme that catalyzes the degradation of free heme to free ferrous iron, carbon monoxide (CO) and biliverdin [14].

Among non-enzymatic antioxidants, glutathione (GSH) plays an important role in maintaining cellular redox status [18]. It exists in two forms: the reduced form GSH, involved in the management of radical species, and the oxidized form GSSG, whose GSSG/GSH ratio can serve as a good indicator of cellular redox status [19].

### 3 Relationship between inflammation and oxidative stress

Oxidative stress and inflammation are two closely related processes, as one can easily induce the other. On the one hand, free radicals are important mediators in triggering or sustaining inflammatory processes [20]. Numerous studies show that the production of excess ROS/RNAs, as well as certain natural or artificial chemicals, initiate the inflammatory process, leading to the synthesis and secretion of pro-inflammatory cytokines. Also, by inducing cellular and tissue damage, these reactive species can indirectly trigger an inflammatory response [21]. On the other hand, upon induction of the inflammatory process, inflammatory cells release reactive species at the site of inflammation, resulting in oxidative stress, which in turn leads to cellular damage, showing that these two processes are intimately linked and can amplify each other [22].

The transcription factor Nrf2 also shows anti-inflammatory activity by inhibiting pro-inflammatory mediators, including cytokines, COX-2, inducible NO synthase and the NF- $\kappa$ B signaling pathway [10,23–25].

### 4 The relationship between inflammation and oxidative stress in pathophysiological processes

Accumulating research over the last few decades suggests that oxidative stress is involved in the aetiology of numerous chronic diseases such as atherosclerosis, diabetic complications, cardiomyopathies including ischemic heart disease, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Alzheimer's disease and Parkinson's disease, as well as cancers [16]. Chronic inflammation, meanwhile, is closely implicated in the pathogenesis of several diseases, including inflammatory bowel disease, cancer, diabetes, cardiovascular disease, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and neurodegenerative disorders [26,27]. In the case of cancer, for example, several authors have proposed that pro-inflammatory factors such as NO, iNOS, COX-2 and NF- $\kappa$ B could be considered oncogenic. For example, iNOS overexpression

has been shown to be associated with the development of certain brain tumours, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, pancreatic cancer and skin cancer [16]. NO has been shown to be involved in mutagenesis and carcinogenesis [28], and deregulation of COX-2 expression is associated with the development of tumours of the breast, lung, colon, rectum, head and neck, pancreas, stomach or prostate [28]. Finally, pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1B and IL-6 also play a key role in inflammation and tumor progression [29].

In the case of cardiovascular disease, the role of chronic inflammation and oxidative stress is also well documented. Indeed, the increase in ROS associated with the production of inflammatory mediators, in association with other risk factors, can lead to vascular endothelial dysfunction, which in turn promotes the development and progression of cardiovascular disease. Certain risk factors that induce inflammation stimulate the secretion of pro-inflammatory chemokines such as interleukin IL-8 and MCP-1, as well as the expression of endothelial adhesion molecules, notably VCAM-1 and ICAM-1. This inflammatory environment promotes monocyte adhesion to the endothelium, altering the integrity of the latter and consequently favoring the development of various cardiovascular diseases [30,31].

### 5 Polyphenols and inflammation

Currently, conventional drugs such as glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used to treat inflammation. However, the occurrence of side effects is a drawback to their use. Continued use of NSAIDs could lead to damage to both the gastrointestinal tract and the kidneys [32]. Glucocorticoids, for their part, can lead to metabolic disorders favouring osteoporosis and musculoskeletal dysfunction, gastrointestinal, cardiovascular, neuropsychiatric and immunological disorders [33,34]. Thus, despite their important role in the management of pain and inflammatory conditions there is a need to find an effective alternative for the prevention of inflammation [35]. Accumulating data in the literature suggests that active compounds found in food exhibit beneficial anti-inflammatory properties with fewer side effects [36–39].

Polyphenols are secondary metabolites synthesized by plants, known to have beneficial properties for human health such as antioxidant and anti-inflammatory activities. They can be divided into two families: flavonoids (anthocyanins, flavan-3-ols, flavonols, flavanones, flavanonols, flavones and chalcones) and non-flavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and stilbenes) [38,39]. Polyphenols can exert anti-inflammatory effects, notably by inhibiting the production and secretion of pro-inflammatory mediators (chemokines)

or by inhibiting the synthesis of various enzyme systems involved in the inflammatory response (COX-2, LOX and iNOS). In most cases, polyphenols act by inhibiting transcription factors (NF- $\kappa$ B and AP-1) that control the synthesis or regulation of these inflammatory mediators. Also, insofar as inflammation and oxidative stress are intimately linked, the antioxidant properties of polyphenols contribute to their anti-inflammatory properties [39,40].

### 6 Polyphenols and oxidative stress

Polyphenols are the most abundant antioxidant compounds in our diet. Their anti-free radical activity is a major contributor to their health benefits. These properties are explained by their redox potential, which enables them to act as reducing agents, generating hydrogen to trap singlet oxygen, or chelating and trapping free radicals [41]. The antioxidant efficacy of polyphenols largely depends on their ability to donate a hydrogen atom, which is directly linked to the number of phenolic hydroxyl groups present, but also to the position of these groups in the molecule [41–43]. The antioxidant activity of polyphenols has been shown to be as effective as, or far more important than, that of essential vitamins such as A, C and E [42–45]. Polyphenols can also exert their antioxidant activity by inhibiting the synthesis of enzymatic systems that lead to the production of radical species (NAD(P)H oxidase, Xanthine oxidase, NO synthase) or by stimulating the synthesis of enzymatic systems involved in the degradation of these radical species (HO-1, SOD, catalase, glutathione peroxidase). In most cases, polyphenols act by stimulating the transcription factor Nrf-2, which controls transcriptional regulation of these enzyme systems.

### 7 Interaction phenomena between compounds

In medicine, many therapeutic strategies use drug combinations to obtain or enhance a therapeutic effect, while reducing drug doses and thus toxicity. In our food or in plant extracts, we often find a complex and diverse array of active substances that can interact with each other [46]. As a result, the biological effect cannot be attributed to a single compound, but rather to the interactions of complex mixtures of molecules. These interactions can either enhance or diminish the biological effect. There are three types of interaction: synergistic, additive and antagonistic. Synergism occurs when the combined effect of two molecules is greater than the sum of the effects of the two individual molecules ( $1+1 \geq 2$ ), antagonism when the combined effect of two molecules is less than the sum of the effects of the two individual molecules ( $1+1 \leq 1$ ), and additivity when the combination of two molecules gives an effect identical to the sum of the effects of the two individual molecules ( $1+1=2$ ). Because of the complexity of the

biological system represented by a cell or organism, the assessment of interactions is not as straightforward as that described by these simple calculations. This is why various methods have been developed to determine the nature of interactions [47]. In a recent paper, Fu and colleagues [48] listed a dozen methods published in the literature for determining interactions, such as the Chou et Talalay combination index method, Berenbaum's isobole method, Bliss's method, etc. Of all these methods, the Chou-Talalay combination index remains the most widely used. Several hypotheses exist to explain how the combination of two or more phytochemicals can exert synergistic anti-inflammatory effects. For example, one phytochemical may enhance the bioavailability of another that supports the beneficial activity for the body. Also, several substances may target identical and/or different signalling pathways that lead to the biological effect. With regard to antioxidant effects, several hypotheses have also been put forward. A synergistic effect may occur when the less effective antioxidant regenerates the more effective one, or when one compound sacrifices itself to protect another antioxidant, or when two antioxidant compounds possess different antioxidant mechanisms. An antagonistic effect can occur when the more effective antioxidant regenerates the less effective one. Finally, an additive effect can be explained when both antioxidants have the same efficacy [49,50].

## **II. Matériels et méthodes**

All relevant information on synergistic, additive and antagonistic interactions of polyphenols for antioxidant, anti-inflammatory effects was collected from the literature using PubMed and Google Scholar databases over the period 2000 to 2022 using the following keyword combinations: "polyphenols, interaction, synergy" / "polyphenols, interaction, antagonism" / "polyphenols, interaction, additivity". The initial search identified a huge amount of articles. The articles selected were those dealing with the effects of polyphenols found in at least 5 different foods, obtained from the Phenol-Explorer database.

## **III. Anti-inflammatory effects of polyphenol combinations**

### **1. Effects observed in vitro**

The main cell model used to study interactions is represented by the LPS-stimulated murine macrophage cell line RAW 264.7. Only a few studies have used human monocytes cell lines such as THP-1. Some studies used endothelial cell models (HUVEC or EA.hy 926), cancer cell models (HTC-16, K562, HELA, lung cancer cells) or fibroblast models (3T3-L1, BJ-5ta).

Surprisingly few studies used primary cultures of macrophages isolated from humans or animals. In the majority of articles, the inflammatory markers measured were NO production and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and PGE-2). In parallel, the authors often measured the expression of enzymes responsible for the production of some of these markers, such as inducible NO synthase and COX-2.

In all studies, the authors show that exposure to polyphenols alone or in combination induces a reduction in the expression of these inflammatory markers or the enzymes that produce them. The mechanisms involved, when studied, most often involve inhibition of the NF- $\kappa$ B transcription factor signalling pathway, either by reducing its expression or its nuclear translocation. The signaling pathways involved in the combinatorial effects of polyphenols have been evaluated by several research groups. During the inflammatory response, translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus is an important step for its activation, which can then lead to the stimulation of inflammatory gene expression, resulting in the secretion of inflammatory markers. This occurs via phosphorylation of I $\kappa$  $\beta$ , which releases NF- $\kappa$  $\beta$  to enable its translocation into the nucleus and stimulation of inflammatory gene expression. In this context, the combination of luteolin and chicoric acid was shown to suppress I $\kappa$  $\beta$  phosphorylation. The authors also showed that this combination could inhibit Akt phosphorylation, but had no effect on MAPK phosphorylation (p-p38, p-ERK and p-JNK) [51]. From our point of view, this represents an interesting observation, since it has been shown that the combination of other polyphenols such as quercetin and catechin or the combination of silibinin and thymol could also inhibit the activation of the NF- $\kappa$  $\beta$  signaling pathway, but through a synergistic inhibition of MAPK phosphorylation and thus their activation [40,52].

Table 1 summarizes the interactions between polyphenols in the regulation of the inflammatory response. Compounds belonging to all polyphenol families were used in the studies we reviewed. In most articles, interactions were studied between two compounds, often belonging to different subfamilies, but sometimes to the same subfamily. Among these flavonoids, the flavonol subfamily with quercetin and the stilbene subfamily with resveratrol are the most represented. Only one article reports on interactions between anthocyanins. Curcumin, a polyphenol belonging neither to flavonoids nor phenolic acids but to the curcuminoid family, is also frequently used in combination. The results of these interactions have been measured by various methods, and show both additive and synergistic effects. Only one study reported antagonistic effects, particularly for combinations of epigallocatechin gallate and genistein, epigallocatechin gallate and resveratrol, and genistein and resveratrol. Interestingly, these



combinations produce antagonistic effects when the concentrations of each compound are high, whereas the effects become additive or synergistic when lower concentrations are used. However, no study has attempted to explain the mechanisms by which interactions between compounds occur.

Numerous articles have demonstrated that the combination of resveratrol and curcumin can have additive or synergistic effects in regulating the inflammatory response. For Csaki et al. the combined use of these two agents synergistically inhibits the expression of enzyme systems involved in the inflammatory response, such as COX-2 in human chondrocytes. This inhibition is explained by inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling pathway by blocking its nuclear translocation [53]. Similarly, Sharma et al. showed that the equimolar combination of resveratrol and curcumin synergistically inhibited IFN- $\gamma$  and IL-4 cytokine secretion and proliferation in murine splenocytes [54]. Zhang et al. suggested that the combination of curcumin and resveratrol at doses very close to physiological levels in humans protected against TNF- $\alpha$ -induced vascular inflammation in both in vitro and in vivo models [31]. Combining resveratrol with hydroxytyrosol exhibited a synergistic anti-inflammatory effect by decreasing PGE2 production [24]. Similarly, an earlier study observed these same inhibitory effects on PGE2 production when resveratrol was combined with its oligomers [55]. Several studies also report synergistic interactions between quercetin and certain anti-inflammatory phenolic compounds. For example, it was suggested that the combination of quercetin with curcumin showed synergistic anti-inflammatory effects in decreasing NO production, COX-2 expression [56]. Interestingly, the combination of these compounds at low concentrations showed either similar or superior inhibitory effects to high concentrations of individual molecules. This effect would be mediated by inhibition of NF- $\kappa$ B transcription factor activation. Similarly, Li et al. showed that quercetin and catechin were able to synergistically suppress the production of pro-inflammatory mediators including cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting several targets involved in the NF- $\kappa$ B and MAPK signalling pathways mediated by the TLR4-MyD88 pathway [57]. In 2017, Agah et al showed a similar enhanced effect when combining quercetin with apigenin that down-regulated pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8) in CCD-18 cells co-stimulated by LPS. This synergistic inhibition of cytokine expression by quercetin-apigenin combinations was mediated in part by inhibition of NF- $\kappa$ B expression [58]. Finally, a combination of quercetin and astragalgin has been shown to synergistically inhibit the production of inflammatory mediators such as NO, PGE2, IL-6 and also iNOS expression [59].

## 2. Effects observed in vivo

The anti-inflammatory effects of polyphenol combinations have also been measured in vivo by some authors, and are summarized in Table 1. These studies have mainly been carried out in rats and mice.

In the majority of articles, the inflammatory markers measured were the production of pro-inflammatory cytokines or chemokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, or MCP-1), or anti-inflammatory cytokines (IL-10). Interestingly, in some studies the authors also measured the effects of these combinations on inflammatory responses at tissue level, such as cutaneous edema, inflammatory cell infiltrates or monocyte adhesion to vascular endothelium.

In all studies, the authors show that exposure to polyphenols alone or in mixtures induces a reduction in the expression of these inflammatory markers, as well as a reduction in cutaneous edema formation, a decrease in inflammatory cell infiltration and inhibition of monocyte adhesion to the vascular endothelium. Very few studies have focused on identifying the signaling pathways involved in the observed effects, apart from the study by Zhao et al. showing the involvement of the sirtuin pathway or the study by Vazquez Prieto et al. showing the involvement of the C-Jun and p38 kinase pathways [60,61]. Finally, inhibition of monocyte adhesion to the vascular endothelium is associated with a decrease in VCAM-1 expression. Almost all studies highlight additive, but above all synergistic, effects of polyphenol combinations on anti-inflammatory activities in vivo.

As with in vitro studies, the polyphenols most frequently used are resveratrol, curcumin and quercetin. Other classes of polyphenols have also been studied, including flavanols (catechin), flavones (luteolin), flavones (baicalin), anthraquinones (emodin), phenols (salidroside) and tannins (ellagic acid).

Interestingly, the combination of quercetin with catechin [59] or resveratrol synergistically reduces inflammation in adipose tissue, which could have a beneficial effect in preventing the development of obesity. The combination of curcumin with resveratrol or luteolin synergistically inhibits monocyte adhesion to vascular endothelium, thus limiting inflammatory cell infiltration at tissue level in mice. Taken together, these results clearly illustrate the anti-inflammatory properties of polyphenols in in vivo models, and above all the enhanced beneficial effects of their use in combination.

#### **IV. Antioxidant effects of polyphenol combinations**

The results of polyphenol interactions in relation to their antioxidant activities has been measured in cell-free models to highlight their intrinsic antioxidant properties or anti-radical activity, but also in cellular systems to highlight their ability to modulate the expression or activity of pro-oxidant or anti-oxidant enzyme systems.

##### **1. Effects of polyphenol combinations on cell-free antiradical activity**

Detailed results of polyphenol interactions on anti-free radical activities are reported in Table 2. Anti-radical activities were measured in several cell-free models. The antioxidant effects of polyphenols are due to their capacity to reduce ROS by donating a hydrogen atom to a wide range of ROS, or by trapping them directly to neutralize them. They also have the ability to chelate transition metals such as iron or copper, thus directly reducing the rate of the Fenton reaction and preventing oxidation caused by highly reactive hydroxyl radicals. Most measurement models are based on these properties, and among these the most widely used are represented by the reduction of the DPPH or ABTS radical, or the reduction of ferrous iron in the FRAP assay. The free radical scavenging test is most often represented by the NO scavenging test. Within a polyphenol mixture, some authors explain additive interactions by a specific and independent anti-radical activity of one polyphenol in relation to the other. Synergistic or antagonistic interactions can be explained by a regenerative mechanism. A less effective compound regenerates the more effective antioxidant compound, hence the synergy, or conversely, a more effective antioxidant regenerates the less effective one, hence the antagonism. Most studies show additive or synergistic effects. The combinations studied are sometimes very complex, ranging from mixtures of two or even 3, 4 or 5 different polyphenols [41,62,63]. The result of interactions is different depending on the combination of compounds and the number of compounds in the mixture. For example, the combination of resveratrol and curcumin shows synergistic effects, whereas when resveratrol is combined with quercetin, the mixture shows additive effects [64]. Interestingly, according to some authors, synergistic effects are more marked at low concentrations of mixtures than at high concentrations for the same mixtures, which then show additive or even sometimes antagonistic effects [65]. Similarly, results can also differ depending on the test used for the same polyphenol blend. For example, the mixture of quercetin and rutin shows synergistic activity when studied by the FRAP method, whereas it shows antagonistic activity when assessed by the ORAC method [66]. The same behavior was observed for a mixture of quercetin and resveratrol [64].

Considering these results, it is clear that it is difficult to establish the nature of the interactions of a mixture of compounds using a single antioxidant activity assay. As antioxidant activity tests take different parameters into account, it is very likely that the differences observed in interactions result from different antiradical mechanisms at play, depending on the combinations of compounds and the concentrations and proportions used within the mixture.

## 2. Effect of polyphenol combinations on *in vitro* antioxidant activities

The results of polyphenol combinations on their antioxidant activities *in vitro* have been obtained in various human and animal cell models. In these cellular models, antioxidant activities were estimated by measuring intracellular ROS production or lipid peroxidation, but also by measuring intracellular glutathione concentrations and the activity or expression of prooxidant (NADPH oxidase) or antioxidant (HO-1, SOD) enzyme systems.

The antioxidant effects of polyphenol combinations are summarized in Table 3. All studies show that polyphenols alone or in mixtures have an antioxidant effect, with a reduction in the production of reactive oxygen species, a decrease in lipid peroxidation, and an increase in the expression or activity of enzyme systems (SOD, CAT, GR, HO-1) involved in the detoxification of ROS, or a decrease in enzyme systems involved in the production of reactive oxygen species (NADPH oxidase). All the studies we have reviewed report synergistic effects, with the exception of the study by Mikstacka et al. Interestingly, the authors show additive or synergistic effects of combinations of quercetin and resveratrol or resveratrol and pterostilbene for low concentrations below 10 or 60  $\mu\text{M}$ , respectively. At higher concentrations, however, these combinations exert antagonistic effects. Combinations of quercetin and pterostilbene, on the other hand, exert antagonistic effects at all concentrations. Where signalling pathways have been described, they involve activation of the Nrf2 pathway [67].

As in the case of anti-inflammatory studies, the most frequently used polyphenols are resveratrol and its derivative pterostilbene, curcumin and quercetin. Other classes of polyphenols have also been studied, including flavanols (catechin), flavones (baicalein), flavonones (naringenin, rutin), isoflavones (genistein, calycosin), phenolic acids (caffeic acid) and olive polyphenols (oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol).

The different families of polyphenols studied all show antioxidant activity to varying degrees, and virtually all combinations show either additive or synergistic antioxidant effects. For example, the combination of resveratrol with genistein or catechin or quercetin or curcumin

exerts a synergistic antioxidant activity demonstrated either by a decrease in ROS production or by a decrease in lipid peroxidation ([68–70]. This antioxidant activity is associated with a decrease in NADPH oxidase expression with maintenance of expression levels of antioxidant enzymes such as SOD and CAT [68]. Similarly, the combination of quercetin with naringenin and rutin, or with catechin, exerts synergistic antioxidant activity. On the other hand, the combination of quercetin with pterostilbene exerts an antagonistic activity, indicating that the nature of the interaction may depend on the nature of the polyphenol. The nature of the interaction, for the same combination of polyphenols, may also depend on the dose, which represents an important parameter, since additive and synergistic effects can sometimes be observed at low doses and antagonistic effects at high doses [67].

### 3. Effects of polyphenol combinations on antioxidant activities in vivo

The antioxidant effects of polyphenol combinations have been measured in vivo by a number of authors, mainly in rats, mice and rabbits. In these animal models, the authors mainly measure markers of lipid peroxidation (MDA, total antioxidant activity) as well as the expression of enzyme systems involved in either the production (myeloperoxidase) or detoxification of reactive oxygen species (SOD, CAT, GPx). Interestingly, two studies measured both markers of oxidative stress but also markers of inflammation such as TNF- $\alpha$  production [71] or inflammatory cell infiltration [72]. The in vivo antioxidant effects of polyphenol combinations are summarized in Table XX. Some studies combine both in vitro and in vivo approaches. In all studies, the authors show synergistic antioxidant effects of polyphenol combinations. Where they have been studied, the mechanisms highlight an alteration in the Nrf2 signalling pathway, which is restored by the combination of polyphenols.

In vivo antioxidant effects were demonstrated using several families of polyphenols, including phenolic acids (curcumin, gallic acid, caffeic acid), tannins (tannic acid), flavonols (quercetin), flavones (baicalein), isoflavones (calycosin) and stilbene (resveratrol). As in the case of anti-inflammatory effects, antioxidant activity has been demonstrated above all with combinations involving resveratrol and curcumin.

The different families of polyphenols studied all show antioxidant activity to varying degrees, and virtually all combinations show either additive or synergistic antioxidant effects. For example, in rats, 4-week treatment with fipronil, a phenylpyrazole class insecticide, increases NO and MDA levels in the liver, kidneys and brain, and decreases levels of reduced glutathione, as well as lowering the expression of antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx. This

oxidative stress, associated with markers of tissue damage, was significantly reduced by co-treatment of the animals with resveratrol (20 mg/kg) or curcumin (200 mg/kg). Interestingly, the combination of resveratrol and curcumin at the same doses as used individually synergistically inhibited all markers of oxidative stress [73]. In this study, the authors do not clearly identify the antioxidant action mechanisms of these combinations, but they do hypothesize that this synergy can be explained by regeneration phenomena. For example, resveratrol may be able to regenerate oxidized curcumin by reducing it, thus potentiating its antioxidant capacity to trap free radicals [74]. These polyphenols may also act jointly on the Nrf2 signalling pathway, modulating the expression of antioxidant enzyme systems.

The endothelial dysfunction observed during the progression of diabetes is often the consequence of oxidative stress *in vivo*, which participates in the development of microangiopathy and constitutes a risk factor for numerous cardiovascular pathologies. In this context, Wang et al. studied the interactions of curcumin with baicalein (a polyphenol of the flavone family), on oxidative stress both at cellular level and in rats. These authors demonstrated that treatment with the equimolar combination of these two polyphenols was able to limit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity in cultured endothelial cells. This effect is associated with a reduction in ROS production, induction of HO-1 and stimulation of SOD activity, and would most certainly involve the Nrf2 signalling pathway. *In vivo*, in a rat model of diabetes induced by a high-fat diet, these authors demonstrated the presence of oxidative stress by measuring a decrease in the expression of HO-1, SOD and the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, and an increase in the expression of myeloperoxidase. The combination of baicalein and curcumin is able to synergistically restore the expression of these oxidative stress markers to the same level as those observed in the control group, thus demonstrating an antioxidant effect of this combination. This synergistic effect was particularly noticeable for HO-1 expression. In fact, the individual compounds are not able to restore the expression of HO-1, which is impaired in diabetic rats, whereas the combination restores the expression of this enzymatic system to the level of the control group. Interestingly, the combination of these two polyphenols exerts a protective effect on endothelial function by preventing alteration of endothelial NOS expression and maintaining normal endothelial wall structure. According to these authors, the protective effects of this combination are partly due to anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects, and they suggest above all that the synergistic action of this combination is due to the action of these two polyphenols on different targets.

#### 4. Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenol combinations

Interestingly, some authors have been able to measure the effects of polyphenol combinations on both their ability to inhibit inflammatory and oxidative stress, in both cellular and animal models, clearly indicating the link between these two pathophysiological processes, which can be controlled by polyphenol properties. To highlight these effects, most studies measure the production of NO, ROS and various pro-inflammatory cytokines, as well as the enzyme systems involved in their production. Most of the polyphenols used belong to the flavonols (quercetin, myricetin), flavanols (catechin), flavones (baicalein, apigenin), curcumoids (curcumin) and flavolignans (silibinin) families.

Most studies show additive or synergistic effects. For example, the combination of curcumin and quercetin prevented oxidative damage and the inflammatory response induced by diazinon, an organophosphate pesticide, in rats in a synergistic manner compared to compounds alone. Similarly, the combination of these same compounds was able to limit acute inflammation induced by carrageenan administration in mice. This anti-inflammatory effect is associated with a decrease in oxidative stress markers [75]. Nevertheless, we noted a few studies in which either no interaction or antagonistic interactions were observed. For example, luteolin and chicoric acid are both individually able to suppress oxidative stress in LPS-stimulated RAW 264.7, but their combination has no additive or synergistic effect, whereas the same combination synergistically inhibits the production of markers of inflammation [51]. So, despite the well-documented relationship between the inflammatory response and oxidative stress, some combinations may synergistically inhibit the inflammatory response without having any effect on oxidative stress.

#### **V. Effects of polyphenol combinations on anti-inflammatory and antioxidant processes in disease models**

Insofar as oxidative stress and inflammation are associated with the development and progression of a number of chronic diseases, a number of studies have highlighted the beneficial effects of polyphenols in combination in in vitro and in vivo pathological models. These models mainly concern cancer, cardiovascular disease and metabolic diseases such as diabetes or dyslipidemia associated with obesity, and are summarized in Tables (1,3,4) and the following paragraph.

For example, the combination of curcumin and resveratrol has been shown to synergistically inhibit the growth of colon cancer cells *in vitro*, and to inhibit tumour growth of these cells *in vivo* in mice [76]. Similarly, an equimolar mixture of anthocyanins (cyanidin, malvidin, peonidin, petunidin and delphinidin) is able to limit the growth of lung cancer cells in mice without altering their viability. *In vivo*, bilberry extract containing these anthocyanins inhibited xenograft cell growth in nude mice to the same extent as delphinidin alone. The authors point out, however, that the concentration of delphinidin in the extract is 8 times lower than that of delphinidin alone, confirming this synergistic activity *in vivo* [77]. Finally, a study has shown that a combination of resveratrol and gallic acid inhibits skin tumorigenesis. This effect is thought to be due in part to synergistic anti-inflammatory activity, demonstrated by inhibition of COX-2 [78]. Some authors also suggest that polyphenol combinations exert a photoprotective effect against UVB-induced damage, which is also known to be involved in skin tumorigenesis, as has been shown for genistein and daidzein [79]. Another mechanism explaining these protective effects against tumour development would also involve inhibition of the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B signalling pathway associated with stimulation of tumour cell apoptosis.

In addition to their beneficial effects on tumour development, polyphenol combinations are also showing their value in the development of cardiovascular disease, in particular by preventing endothelial dysfunction. For example, the combination of curcumin and resveratrol synergistically inhibits TNF- $\alpha$ -induced vascular inflammation in mice [31]. The authors suggest that this effect is mediated through inhibition of monocyte adhesion to the vascular endothelium by synergistically decreasing the expression of adhesion molecules, which was also confirmed by the same team using a combination of curcumin and luteolin [30]. Finally, a number of studies have focused on the prevention by polyphenol combinations of the development of metabolic diseases such as diabetes or obesity and their complications. In these pathologies, an inflammatory component at systemic level and in adipose tissue plays a predominant role. Various authors show that most of the polyphenol combinations studied (catechin and quercetin, resveratrol and quercetin, fisetin and luteolin) exert synergistic anti-inflammatory effects *in vivo* by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines at systemic level but also of adipocytokines at adipose tissue level [60,61,80].

Numerous combinations of polyphenols have also been studied in other inflammatory models, and in each have shown either an additive or synergistic anti-inflammatory effect. For example, the combination of resveratrol, polydatin and emodin, the combination of baicalein and emodin



or the combination of resveratrol and eriocitrin respectively showed greater efficacy than the molecules alone in a mouse model of ulcerative colitis or TPA-induced skin edema [57,81,82]. Interestingly, the anti-inflammatory effect of the combination of resveratrol and eriocitrin exerts a stronger effect than ibuprofen, a reference non-steroidal anti-inflammatory drug [81]. Finally, combinations of curcumin and saliroside or curcumin, polydatin and quercetin reduce inflammation measured at serum level but also stress-induced inflammation in the central nervous system in rats [83,84]. This effect is similar to that of fluoxetine, a serotonin reuptake inhibitor antidepressant, and the authors suggest that the combination of could have a beneficial effect in the management of stress-induced depression [83].

A study reports on a clinical trial designed to estimate the effect of a resveratrol-enriched grape extract on markers of atherogenesis. The trial involved 75 patients who were divided into three groups of 25 patients each, who consumed either maltodextrin (control group), grape extract or the same grape extract enriched with resveratrol. After 6 months of daily consumption, no change was observed in the control group, whereas the authors observed a reduction in LDL cholesterol concentration in the group treated with grape extract. On the other hand, in the group treated with resveratrol-enriched grape extract, the authors observed a significant reduction in blood concentrations of LDL cholesterol, oxidized LDL and apolipoprotein-B, with no change in liver, kidney or thyroid function. Thus, even if these are not pure compounds as in most in vitro or in vivo studies, these results seem to highlight synergistic effects between polyphenols, since the presence of resveratrol seems necessary to obtain these effects on markers of atherogenesis [85].

**Table 1:** Anti-inflammatory effect of polyphenols combination

Compounds	Concentrations (proportion in the mixture)	Study model	Observed effects	Nature of the interaction	References
Apigenin Quercetin	Apig and Quer : 0.25-1 $\mu$ M (1:0 ; 1:1 ; 1:3)	Colon myofibroblats	$\downarrow$ of production TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 $\downarrow$ of expression NF- $\alpha$ B	Synergy or Additivity	[58]
Resveratrol Hydroxytyrosol	Resv : 1 $\mu$ M HTyr : 10 $\mu$ M (1:10)	Murine Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ of production PGE-2	Synergy	[24]
Chlorogenic acid Curcumin	Chlor Ac : 5 $\mu$ M Curc : 5 $\mu$ M	Human THP-1 macrophages	$\downarrow$ expression TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 $\downarrow$ expression COX-2 and $\uparrow$ expression iNOS $\downarrow$ expression TLR-4 and NF- $\kappa$ B	Synergy	[86]
Silibinin Thymol	Sili : 10-50 $\mu$ M Thy : 30-150 $\mu$ M (1:3)	Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ production of NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 and ROS $\downarrow$ expression COX-2 $\downarrow$ NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways	Synergy	[52]
Resveratrol Curcumin	Res: 10 mg/kg Cur: 100 mg/kg	Rats (ligature around first molars induced periodontitis)	$\downarrow$ production of IL-1 $\beta$ in gingival tissue No effect on the production of TNF- $\alpha$ No effect on the progression of periodontitis	Additivity	[87]
Resveratrol Curcumin	Resv and Curc : 50 $\mu$ M	Human chondrocytes	$\downarrow$ expression of COX-2, MMP-3, MMP-9 and VEGF $\downarrow$ activation of NF- $\kappa$ B	Synergy	[53]
Tangeritin Luteolin	Tan : 30 $\mu$ M Lut : 15 $\mu$ M	Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ production of NO, PGE2, IL-1 $\beta$ and IL-6 $\downarrow$ expression of iNOS and COX-2.	Synergy	[28]
Quercetin Curcumin	Quer : 11.39 $\mu$ M Curc : 2.85 $\mu$ M	K562 leukemic cells	$\downarrow$ production of NO $\downarrow$ expression of COX-2 Inhibition of NF- $\kappa$ B activation	Synergy	[56]

Chrysin Kaempferol Morin Silibinin	Range: 0-200 $\mu$ M  Kaem + Chry Kaem + Mor Kaem + Sili Chry + Mor Chry + Sili  Mor + Sili	Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ production of NO, PGE-2 and TNF- $\alpha$	Synergy  Additivity	[88]
Curcumin Quercetin	Cur:50mg/kg Que:50mg/kg (2weeks treatment)	Carrageenan injection in Rats	$\downarrow$ production of NO $\downarrow$ production of TNF- $\alpha$ $\downarrow$ of carrageenan-induced oedema $\downarrow$ of carrageenan-induced lymphocytes infiltration	Synergy	[75]
Apigenin Curcumin	Apig: 1,5-6 $\mu$ g/mL Cur: 1,5-6 $\mu$ g/mL (various proportions)	Raw 264.7 macrophages	Nano-encapsulated compounds $\downarrow$ production of NO, ROS, IL-6 and TNF- $\alpha$ $\downarrow$ expression of iNOS and COX-2	Synergy	[89]
Génistein Daidzein	Gen : 2-10 $\mu$ M Dai : 8-30 $\mu$ M (1 :3)	Human skin fibroblasts	$\downarrow$ expression of COX-2	Synergy	[79]
Delphinidi Peonidin Malvidin Cyanidin Petunidin	Delp: 10-30 $\mu$ M Peo: 10-30 $\mu$ M Mal: 10-30 $\mu$ M Cya: 10-30 $\mu$ M Pet: 10-30 $\mu$ M (1:1:1:1:1))	Human non- small-cell lung cancer cells	$\downarrow$ expression of NF- $\kappa$ B	Synergy	[77]
Fisetin Luteolin	Fis: 0.5-1 $\mu$ M Lut: 0.5 $\mu$ M (1:1)	Human THP-1 macrophages	$\downarrow$ production of IL-6, TNF- $\alpha$ and ROS $\downarrow$ activation of NF- $\kappa$ B and HAT $\uparrow$ activation of SIRT1 and FOXO3a	Synergy	[80]
Resveratrol Ellagic acid	Res: 2.5 $\mu$ mol equivalent administered topically	Mice DMBA-induced skin carcinogenesis	$\downarrow$ expression of COX-2 mRNA	Synergy	[78]

	Ela Ac: 1% in drinking water				
Biochanin A 6-Gingerol Genistein	Bio A.: 10-15 µg/mL 6-Gin: 5-15 µg/mL (2 :1)  Gen: 5 µg/mL 6-Gin: 5-25 µg/mL (5:1 or 1:5)	Raw 264.7 macrophages	↓ production of NO, IL-1β, IL-6 and TNF-α - Inhibition of MAPK signaling pathway	Synergy	[90]
Quercetin Catechin	Que : 1-7 µM Cat : 15-175 µM (1:25)	Raw 264.7 macrophages	↓ production of NO, TNF-α and IL-1β ↓ expression of TNF-α and IL-1β, iNOS and COX-2 ↓ expression of NF-κB Inhibition of MAPK signalling pathway Restoration of the expression of targeted genes of TLR4/MyD88 pathway	Synergy	[40]
Resveratrol Polydatin Emodin	Res: 3 µg/mL Pol: 3 µg/mL Emo: 3 µg/mL	Mice (DSS induced colitis)	↓ production of TNF-α, IL-1β, IL-6 in serum ↑ production of IL-10 in serum ↓ expression of NF-κB in colon	Synergy	[57]
Eriocitrin Resveratrol	Erio: 50 µM Res: 5 µM (10:1)	Raw 264.7 macrophages  Mice (TPA induced subcutaneous inflammation)	↓ production of NO, TNF-α and IL-1β ↓ expression of COX-2 and iNOS Inhibition of NF-κB and MAPK signalling pathways  ↓ expression of IL-1β and TNF-α Alleviation of subcutaneous tissue swelling (ear edema)	Synergy	[81]
Chlorogenic acid Luteolin	Chlor Ac: 25µmol/mL Lut: 25µmol/mL (1:1)	Fibroblast-like synoviocytes	↓ expression of NF-κB Activation of JAK/STAT signaling	Synergy	[91]

Curcumin Resveratrol	Cur : 10 $\mu$ M Res : 10 $\mu$ M (1:1)	Human colon cancer cells (HCT-116)	$\downarrow$ expression of NF- $\kappa$ B	Synergy	[76]
Curcumin Polydatin Quercetin	Cur : 1 $\mu$ M Pol : 10 $\mu$ M Que : 0.5 $\mu$ M	Human umbilical vein endothelial cells	$\downarrow$ expression of MCP-1, IL-1 $\beta$ and IL-8 $\downarrow$ expression of RAGE $\downarrow$ phosphorylation of p65-NF- $\kappa$ B	Synergy	[84]
Quercetin Astragalin	Que : 2.5 $\mu$ M Ast : 2.5 $\mu$ M	Peritoneal macrophages	$\downarrow$ production of NO, PGE2 and IL-6 $\downarrow$ expression of iNOS and COX-2	Synergy	[59]
Curcumine Epigallocatech in gallate Resveratrol	Cur : 32 $\mu$ M Epi : 8 $\mu$ M Res : 100 $\mu$ M (1:1)	Hela cells	$\downarrow$ expression of NF- $\kappa$ B	Synergy	[92]
Epigallocatech in gallate Genistein Resveratrol	Epi : 0.04-50 $\mu$ M Gen : 2-25 $\mu$ M Res : 2-50 $\mu$ M	Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ production of NO	Epi/Gen: Antagonist (HD), synergic (LD) Epi/res: Antagonist Gen/res: antagonist at HD, additive at LD	[93]
Luteolin Chicoric acid	Lut: 2-16 $\mu$ M Chi ac.: 4-32 $\mu$ M (1:2)	Raw 264.7 macrophages	$\downarrow$ production of NO, PGE-2, TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ $\downarrow$ expression of iNOS and Cox-2 $\downarrow$ phosphorylation of NF- $\kappa$ B and Akt	Synergy	[51]
Resveratrol Curcumin	Res: 20 $\mu$ M Cur : 20 $\mu$ M (1:1)	Murine splenocytes	$\downarrow$ splenocytes proliferation $\downarrow$ production of INF- $\gamma$ and IL-4	Synergy	[54]
Salidroside Curcumin	Sal: 5 mg/kg Cur: 20 mg/kg	Rats (chronic mild stress model)	$\downarrow$ production of TNF- $\alpha$ and IL-6 in serum $\downarrow$ production of TNF- $\alpha$ in brain tissue	Synergy	[83]

Catechin Quercetin	Cat: 1 $\mu$ M Que: 10 $\mu$ M (1:1)  Cat: 20 mg/kg Que: 20 mg/kg	3T3-L1 adipocytes (TNF- $\alpha$ -induced inflammation)  Rats (fructose-fed model)	↓ of expression pro-inflammatory cytokines: MCP-1 and resistin ↑ of expression of anti-inflammatory cytokines: adiponectin and visfatin  ↓ of protein expression of resistin and visfatin ↓ of production of TNF- $\alpha$ Prevention of adiponectin expression decrease ↓ of p-JNK increase ↓ pf p-38 phosphorylation	Synergy and additivity	[61]
Resveratrol Tyrosol	Res: 3 $\mu$ M Tyr: 10 $\mu$ M (1:1)	Raw 264.7 macrophages (oxLDL)	↓ production of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , arachidonic acid and PGE <sub>2</sub>	Additivity	[94]
Resveratrol $\epsilon$ -Viniferin Ampelopsin A Ampelopsin C Vitisin A Vitisin B	Res: 10 $\mu$ M $\epsilon$ -Vin: 25 $\mu$ M Amp A: 25 $\mu$ M Amp C: 25 $\mu$ M Vit A: 25 $\mu$ M Vit B: 25 $\mu$ M	Human chondrocytes (LPS)	↓ production of PGE <sub>2</sub>	Synergy	[55]
Baicalin Emodin	In vitro: Bai: 50 $\mu$ M Emo: 20 $\mu$ M (1:1)  In vivo: Bai: 25 mg/kg Emo: 5 mg/kg	Raw 264.7 macrophages (LPS)  Mice (DSS induced- colitis)	↓ production of NO ↓ expression of iNOS and p65-NF- $\kappa$ B  ↓ inflammatory cells infiltration ↓ production of IL-6 and IL-1 $\beta$ ↓ expression of iNOS, TLR4 and p65-NF- $\kappa$ B	Synergy	[82]
Curcumin Luteolin	In vitro: Cur: 1 $\mu$ M Lut: 0.5 $\mu$ M	EA.hy 926 endothelial cells (TNF- $\alpha$ )	↓ of monocytes adhesion to EA.hy 926 ↓ expression of VCAM-1, MCP-1 ↓ translocation of NF- $\kappa$ B	Synergy	[30]

	(1:1) In vivo: Cur: 500 mg/kg Lut: 500 mg/kg	Mice (TNF- $\alpha$ )	↓ of monocytes adhesion to aortic endothelium ↓ of VCAM-1 and MCP-1		
Curcumin Resveratrol	In vitro: Cur: 5 $\mu$ M Res: 5 $\mu$ M  In vivo: Cur: 500 mg/kg Res: 200mg/kg	EA.hy 926 endothelial cells (TNF- $\alpha$ )  Mice (TNF- $\alpha$ )	↓ of monocytes adhesion to EA.hy 926 ↓ expression of VCAM-1, MCP-1 ↓ expression of p65-NF- $\kappa$ B  ↓ of monocytes adhesion to aortic endothelium ↓ of VCAM-1 and MCP-1	Synergy	[31]

**Table 3:** Effect of polyphenol combinations on cell-free antiradical activity

Compounds	Concentrations (proportion in the mixture)	Study model	Observed effects	Nature of the interaction	References
Pelargonidin Resveratrol Chlorogenic acid Epigallocatechin gallate	Pel : 0.05-0.5 $\mu$ M Res : 0.01-0.1 $\mu$ M Chlor Ac : 5-50 $\mu$ M Epi : 0.5-5 $\mu$ M	FRAP assay	$\uparrow$ Fe <sup>3+</sup> reducing capacity	Additivity	[95]
Curcumin Resvératrol Quercetin	Cur : 5 $\mu$ M Res : 5 $\mu$ M Que : 5 $\mu$ M	heme-enhanced TMPD oxidation	$\downarrow$ of heme-enhanced TMDP oxidation The effect was more pronounced with the mixture of Cur and Que	Synergy	[74]
Resveratrol Oxyresveratrol Curcumin	Cur: 5 $\mu$ M Oxy: 5 $\mu$ M Resv: 5 $\mu$ M	heme-enhanced TMPD oxidation	$\downarrow$ of heme-enhanced TMDP oxidation Effect more pronounced with Res+Cur	Synergy	[96]
Catechin Protocatechuic acid Vanillic acid	Cat : 0.05mM Prot ac : 1.62mM Van ac : 0.74mM  Cat : 1.72mM Prot ac : 3.2mM Van ac : 2.97mM	FRAP assay DPPH assay ABTS <sup>o+</sup> assay	$\uparrow$ Fe <sup>3+</sup> reducing capacity $\uparrow$ DPPH radical reduction $\uparrow$ ABTS radical reduction Effect more pronounced in the DPPH assay  $\uparrow$ Fe <sup>3+</sup> reducing capacity $\uparrow$ DPPH radical reduction $\uparrow$ ABTS radical reduction Effect more pronounced in the FRAP assay	Synergy Synergy Synergy  Synergy Synergy Antagonism	[50]
Quercetin Rutin Caffeic acid Carnosic acid	Que : 1mM Rut : 1mM Caf ac : 1mM Car ac : 1mM	Lipid oxidation assay FRAP assay ORAC Assay	Mix of Que (67%)+Rut (33%) in ORAC assay Mix of Que (67%)+Rut (33%) in FRAP assay  Mixture of Caf ac (47%)+Car ac (53%)	Antagonism Synergy  Synergy	[66]



Epigallocatechin gallate Quercetin	Epigal : ND Que : ND	DPPH assay	↑ of DPPH scavenging for encapsulated compounds	Synergy	[97]
Chlorogenic acid Hesperidin Luteolin Myricetin Naringenin Coumaric acid Quercetin	Chlo ac: 10.7μM Hes: 10.2μM Lut: 2.45μM; Myr : 0.78μM Nar: 2.61μM Cou ac: 1.95μM Que: 6.62μM	ORAC assay	Combination of 2 compounds : Hes+Myr, Hes+Nar, Hes+Chlo ac  Combination of 2 compounds : Myr+Nar  Combinations of 3 compounds: Hes+Chlo ac+Nar, Hes+Myr+Nar, Hes+Nar+Lut, Her+Nar+Pcou ac and Hes+Nar+Que  All combinations for 4 compounds	Synergy  Antagonism  Synergy  Synergy	[62]
Caffeic acid Ferulic acid Rosmarinic acid	Caf ac: 50-250μM Fer ac: 50-250μM Ros ac: 50-250μM (1:1) and (1:1:1)	Briggs-Rauscher reaction method	Combination of Ros ac+Caf ac  Combination of Fer ac+Caf ac  Combinations of Fer ac+Ros ac and Caf ac+Ros ac  Combination of the 3 compounds showed synergistic effect at low dose and antagonistic effect at high dose	Antagonism  Synergy  Additive  Synergy or Antagonism	[65]
Cinnamic acid Ferulic acid Syringic acid	Cin ac: 0.125-200μg/mL Fer ac: 0.125-200μg/mL Syr ac: 0.125-200μg/mL Binary combinations	ABTS <sup>o+</sup> assay	Combinations of Cin ac+Fer ac, Cin ac+Syr ac  Combinations of Fer ac+Syr ac	Synergy  Antagonism	[98]
Gallic acid	Gal ac : 150μM Ros ac : 150μM	FRAP assay	All binary combinations	Synergy	[99]

Rosmarinic acid Caffeic acid Chlorogenic acid Quercetin Rutin	Caf ac : 600µM Chl ac: 600µM Que : 150µM Rut : 150µM		Ternary combinations of Que+Gal ac+Chl ac, Que+Gal ac+Rut  Ternary combinations of Rut+Chl ac+Ros ac; Rut+Chl ac+Caf ac; Rut+Ros ac+Gal ac; Ros ac+Caf ac+Chl ac	Synergy  Antagonism	
Catechin Epicatechin Quercetin Rutin Resveratrol	Cat : 2µM Epi : 2µM Que : 2µM Rut : 2µM Res : 2µM	DPPH assay	Binary combinations of Cat+Epi, Que+Rut, Que+Res, Rut+Res  Ternary combination of Que+Rut+Res  Combination of all compounds	Antagonism  Antagonism  Antagonism	[41]
Rutin Kaempferol Resveratrol	Rut: 100-500µM Kae: 100-500µM Res: 100-500µM	DPPH assay	Binary combinations of Rut+Kae, Rut+Res  Binary combination of Kae+Res	Synergy  Antagonism	[100]
Quercetin Resveratrol Caffeic acid	Que, Res, Caf ac Calculation of the IC <sub>50</sub> for each combination for each test	SRD assay NRD assay FRAP assay RP assay DPPH assay ABTS <sup>o+</sup> assay NO assay	Combination of Que+Res in the SRD, FRAP, DPPH, ABTS and NO assays  Combination of Que+Res in the NRD and RP assays  Combination of Que+Caf ac in the ABTS assay  Combination of Que+Caf ac in the FRAP and DPPH assay  Combination of Que+Caf ac in the SRD, NRD, RP and NO Assays	Antagonism  Synergy  Antagonism  Additive  Synergy	[64]

			Combinations of Res+Caf ac or Res+Que+Caf ac in the SRD, DPPH and ABTS assays	Antagonism	
			Combinations of Res+Caf ac or Res+Que+Caf ac in the NRD, FRAP, RP and NO assays	Synergy	
Epigallocatechin Catechin Hyperoside	Epigal, Cat, Hyp	ABTS <sup>°+</sup> assay DPPH assay FRAP assay	Combination of Hyp+Epigal in all tests Strongest synergism for the ratio of 3:1  Combination of Hyp+Cat and Cat+Epigal: No synergistic effects	Synergy	[101]
Epigallocatechin gallate Oxyresveratrol Piceatannol	EpiG:2.5µM Oxy: 2.5µM Pic: 2.5µM	ABTS <sup>°+</sup> assay	Combinations of EpiG+Pic and EpiG+Oxy	Synergy	[102]
Caffeic acid Epicatechin gallate	Caf ac: 9µM Epi: 2.5µM	ABTS <sup>°+</sup> assay	↑ of ABTS <sup>°+</sup> radical reduction	Synergy	[103]
Curcumin Gallic acid	Cur: 50µg/mL Gal ac : 50µg/mL	DPPH assay	↑ of DPPH radical reduction	Synergy	[104]
Quercetin Quercetin-3- <i>O</i> - glucopyranoside Morin	Que, QueG, Mor Calculation of the IC <sub>50</sub> for each combination for each test	ABTS <sup>°+</sup> assay FRAP assay	Combination of Que+Mor in both assays  Combination of Que+QueG in both assays	Synergy  Antagonism	[105]
Gallic acid Protocatechuic acid Chlorogenic acid Vanillic acid	Gal ac, Pro ac, Chlo ac, Van ac  Combination of 2 compound: 100µM	DPPH assay	Combination of Gal ac+Pro ac, Gal ac+Chlo ac, Pro ac+Chlo ac  Combination of Gal ac+Van ac	Synergy  Antagonism  Synergy	[63]

	Combination of 3 compounds: 66µM  Combination of 3 compounds: 50µM		Combination of Gal ac+Pro ac+Chlo ac, Gal ac+Chlo ac+Van ac, Gal ac+Pro ac+Van ac  Combination of Pro ac+Chlo ac+Van ac  Combination of 4 compounds	Antagonist  Synergy	
Caffeic acid Rosmarinic acid Ferulic acid Catechin Quercetin	Caf ac: 0-5µM Ros ac: 0-4µM Fer ac: 0-10µM Cat: 0-5µM Que: 0-1µM	Linoleic acid oxidation assay	Combination of Cat+Caf ac and Que+Caf ac  Combination of Ros ac+Caf ac, Que+Ros	Antagonism  Synergism	[49]
Caffeic acid Coumaric acid Ferulic acid Sinapic acid	Caf ac : 0.25mM Cou ac : 0.25mM Fer ac : 0.25mM Sin ac : 0.25mM	ABTS <sup>o+</sup> assay DPPH assay	ABTS <sup>o+</sup> assay: All binary mix with Caf ac Binary mix with Cou ac+Fer ac Ternary mix with Caf ac+Cou ac+Fer ac All other ternary mix Quaternary mix  DPPH assay: Binary mix with Caf ac+Cou ac Binary mix with Caf ac+Sin ac All other binary mix Ternary mix with Caf ac+Cou ac+Fer ac, Cou ac+Fer ac+Sin ac Ternary mix with Caf ac+Fer ac+Sin ac, Caf ac+Cou ac+Sin ac Quaternary mix	Antagonism Synergy Antagonism Additive Antagonism  Antagoni Synergy Additive Antagonism  Additive Additive	[106]
Curcumin Epicatechin	Cur : 600µM Epi : 50µM	ABTS <sup>o+</sup> assay	Mix ratio of 12 :1 and 6 :1  Mix ratio of 5:1; 2:1; 1.5:1; 1:1;0.8:1 and 0.3:1	Additive  Synergy	[107]
Calycosin	Cal:0.33mg/mL	DPPH assay	DPPH assay:		[108]

Ferulic acid Isoferulic acid	Fer ac:0.62mg/mL Iso ac:0.82mg/mL	FRAP assay ABTS <sup>o+</sup> assay	Binary mix of Cal+Fer ac	Antagonism	
			Binary mix of Cal+Iso ac synergy	Synergy	
			FRAP assay: Binary mix of Iso ac+Cal	Synergy	
			ABTS assay: Binary mix of Iso ac+Cal	Additive	

**Tableau 4:** Effect of polyphenol combinations on *in vitro* antioxidant activities

Compounds	Concentrations (proportion in the mixture)	Study model	Observed effects	Nature of the interaction	References
Quercetin Rutin Naringenin Naringin	Que: 1-100µM Ngenin: 1-100µM Rut: 1-100µM Ngin:1-100µM	DPPH assay HT29 cells	↑ capacity of DPPH reduction ↑ total cellular antioxidant activity	Synergy	[109]
Resveratrol Genistein	Res : 3µM Gen : 1µM	High glucose- treated MDCK epithelial cells	↓ intracellular ROS ↓ intracellular hydroxyl radicals ↓ NADPH oxidase expression ↑ GCS expression ↔ expression of SOD and catalase	Synergy	[68]
Resveratrol Catechin	Res : 20µM Cat : 25-75µM  Cat : 20µM Res : 25-75µM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - or β- AP-treated PC12 cells	↓TBARS formation	Synergy	[69]

Epigallocatechin gallate Epigallocatechin	Epigal : 5µM Epicat : 5µM	FK506-treated LLC-PK1 cells	↓ intracellular ROS	Synergy	[110]	
Oleuropein Hydroxytyrosol	Ole : 6.25-100µM Hyd : 6.25-100µM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated Human dermal fibroblast C	↓ intracellular ROS	Synergy	[111]	
Caffeic acid Epicatechin gallate	Caf ac: 26.6µM Epi: 5µM	HepG2 cells	↑ total cellular antioxidant capacity	Synergy	[103]	
Resveratrol Pterostilbene Quercetin	Que : 2.5-100µM Res : 2.5-100µM Pte : 2.5-100µM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated Human erythrocytes	↓ TBARS formation	Que+Res : 2.5-5µM (Sy) ; 10-80µM (Ad) ; 100µM (An) Que+Pte : 2.5 µM (An) ; 5µM (Ad); 10-100µM (An) Res+Pte : 2.5-40µM (Sy) ; 60-80µM (Ad) ; 100µM (An)	Synergy Additivity Antagonism	[67]
Quercetin Catechin	Que : 15µM Cat :20µM	AngII-treated Vascular smooth muscle cells	↓ ROS production ↓ NAD(P)H oxidase activity ↓ translocation of p47 phox to the cell membrane ↓ of p38MAPK activation	Synergy	[112]	
Calycosin Ferulic acid Isoferulic acid Formononetin	Fer ac: 0.5µg/mL For: 0.125 µg/mL  Fer ac: 0.25µg/mL Cal: 0.5 or 1 µg/mL  Fer ac: 1µg/mL Cal: 0.5µg/mL  Iso ac: 0.25µg/mL For: 0.125 and 0.25 µg/mL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated HepG2 cells	Protection of HepG2 cells against H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced oxidative damage	Synergy  Synergy  Additivity  Synergy	[108]	

	Iso ac: 0.25 and 0.5µg/mL Cal: 0.25µg/mL			Synergy	
Curcumin Baicalein	Cur: 0.47-15µg/mL Bai: 0.47-15µg/mL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated EA. hy926 cells	↓ of ROS production ↑ of HO-1 protein expression ↑ of SOD activity ↓ of MPO activity Stimulation of Nrf2 signaling pathway	Synergy	[71]
Caffeic acid Rosmarinic acid	Caf ac: 1.32µg/mL Ros ac: 26.84µg/mL  Caf ac: 1.32µg/kg Ros ac: 26.84µg/kg	t-BHP-treated HepG2 cells  t-BHP-treated rats	↑ of GSH levels ↓ of MDA production  ↓ of AST and ALT as marker of t-BHP-induced liver damages ↔ of LDH serum levels ↑ of GSH serum levels ↓ of MDA serum levels ↑ of catalase, glutathione peroxidase and SOD	Additivity	[113]
Curcumin Resveratrol	Cur : 3.13-50µM Res : 3.13-50µM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated EAhy926 cells	↓ of ROS production ↑ of Nrf2 nuclear translocation and consequently of its activation ↑ of HO-1 expression ↑ of SOD activity ↑ of NAD production	Synergy	[70]

**Tableau 5:** Effect of polyphenol combinations on in vivo antioxidant activities

Compounds	Concentrations (proportion in the mixture)	Study model	Observed effects	Nature of the interaction	References
Resveratrol Curcumin	Res: 10mg/kg Cur: 200mg/kg (4 weeks treatment, administration once a week)	Fipronil-treated Rat	↓ production of MDA and NO ↑ production of GSH ↑ production of GPx, SOD and CAT	Synergy	[73]
Curcumin Quercetin	Cur : 5mg/kg Que : 100mg/kg (4 weeks treatment)	Diazinon-treated Rats	↓ lipid peroxidation ↑ activity of Gpx, SOD and CAT ↑ production of GSH	Synergy	[114]
Gallic acid Tannic acid	Gal ac : 100mg/kg Tan ac : 100mg/kg (3 weeks treatment)	Alloxan-induced diabetes in Rabbit	↓ production of MDA (effect was more pronounced 2 and 3 weeks after treatment) ↑ of total antioxidant capacity	Synergy	[115]
Sinapic acid Ellagic acid	Sin ac : 20mg/kg Ell ac : 50mg/kg (4 weeks treatment)	Streptozotocin-induced diabetes in Rat	↓ production of MDA ↑ production of GSH ↑ expression of CAT	Synergy	[116]
Calycosin Gallic acid	Cal : 40mg/kg Gal ac : 8mg/kg (3 days treatment)	Isoproterenol-induced myocardial infarction in mice	↓ production of MDA ↓ activity of MPO	Synergy	[72]
Thymol Carvacrol	Thy: 20mg/kg Car: 25mg/kg (2 weeks treatment)	Doxorubicin-treated Rats	↑ production of GSH ↓ production of MDA ↑ SOD, ↑CAT	Synergy	[117]
Apigenin Myricetin	Api: 3mg/kg Myr: 3mg/kg	Cisplatin-treated mice	↑ production of GSH ↓ production of MDA	Additive	[118]



	(1 week treatment)		↑ activity of CAT		
Curcumin Quercetin	Cur:50mg/kg Que:50mg/kg (2weeks treatment)	Carrageena n injection in Rats	↑ production of GSH ↓ production of MDA ↑ expression of HO-1 mRNA	Synergy	[75]
Curcumin Baicalein	Cur: 75mg/kg Bai: 75 mg/kg (4 weeks treatment)	HFD-teated Rats	↑ expression of eNOS and HO-1 ↓ expression of MPO Restoration of Nrf2 expression	Synergy	[70]
Silybin Baicalin	Syl : 100mg/kg Bai : 100mg/kg	CCL <sub>4</sub> -treated Rats	↑ activity of SOD	Synergy	[118]
Caffeic acid Rosmarinic acid	Caf ac: 1.32mg/kg Ros ac:26.84mg/kg (5 days treatment)	<i>t</i> -BHP- treated Rats	↑ production of GSH ↓ production of MDA ↑ activity of CAT, GPx and SOS	Additive	[112]

## **VI. Conclusion**

Many papers described the interaction between natural compounds and have been resumed in the present review. We reported the interactions regarding the antioxidant and anti-inflammatory properties of those compounds and highlighted their roles in the development of some pathologies including cancer and vascular diseases. Some research has also shown their interest for the control of antibiotic resistance that may have some benefit for treatment of infectious diseases. Interactions were shown to be mostly additive or synergic and, in some circumstances, to be antagonistic whatever the studies were performed in acellular, cellular or in vivo models. Therefore, interactions can have beneficial or detrimental effects. The results of these interactions depend on one hand to the compounds in the mixture. No clear correlation has been identified between the nature of the interactions and the polyphenols' families in the mixture. But generally speaking, polyphenols from the same family cooperate together. Among the several hypotheses that explain the mechanisms of these interactions, one involved the formation of new compounds through chemical reactions between existing compounds, and this new compound is responsible of the pharmacological action. If this hypothesis seemed unlikely in most of the case, it could be easily verified with analytical methods. Others, more likely, hypothesis could involve the stimulation by each compound of the same signalling pathway or of different signalling pathway that commonly lead to the biological activity. Also, it is known and largely described that some physiological or biochemical processes are interconnected and could cross react, as for inflammation and oxidative stress for example. Therefore, one could hypothesize those combinations could react on one of them and affect the resultant biological activity of the other.

The use of combinations of natural molecules offers many advantages over the use of single molecules. One molecule can be used in a mixture to modulate the effect of others, enhancing or diminishing their effects. They make it possible to target different signalling pathways in order to potentiate an effect. And finally, they make it possible to use different molecules at low concentrations while achieving the same effect, which can limit the toxicity of individual ones.

This field of research dealing with mixing activity of natural molecules open up new exiting perspectives for the identification of the mechanism of actions of polyphenols on one hand, and for the development of dietary supplements or, why not, drugs on the other hand. To our point

of view, this approach could present a real benefit for the prevention of the onset or progression of chronic pathologies and overall stimulate the signalling pathway of wellness.

## VII. Références

1. Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O.H.; Andersen, P.S.; Girardin, S.E. Chronic Inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in Interleukin-1beta Generation. *Clin Exp Immunol* **2007**, *147*, 227–235, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.
2. Ahmed, S.M.U.; Luo, L.; Namani, A.; Wang, X.J.; Tang, X. Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles in Inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2017**, *1863*, 585–597, doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
3. Slavich, G.M. Understanding Inflammation, Its Regulation, and Relevance for Health: A Top Scientific and Public Priority. *Brain Behav Immun* **2015**, *45*, 13–14, doi:10.1016/j.bbi.2014.10.012.
4. Buhrmann, C.; Mobasher, A.; Busch, F.; Aldinger, C.; Stahlmann, R.; Montaseri, A.; Shakibaei, M. Curcumin Modulates Nuclear Factor kappaB (NF-kappaB)-Mediated Inflammation in Human Tenocytes in Vitro: Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 28556–28566, doi:10.1074/jbc.M111.256180.
5. Kawai, S.; Nakagawa, T.; Sakayori, S.; Kobayashi, O.; Kamiya, S. Effect of Ciprofloxacin on Levels of Lipopolysaccharide and Cytokines in Experimentally Induced Gram-Negative Bacterial Pneumonia in Mice. *J Infect Chemother* **2006**, *12*, 119–123, doi:10.1007/s10156-006-0442-2.
6. Liu, Y.; Liang, X.; Zou, Y.; Peng, Y.; McClements, D.J.; Hu, K. Resveratrol-Loaded Biopolymer Core–Shell Nanoparticles: Bioavailability and Anti-Inflammatory Effects. *Food Funct.* **2020**, *11*, 4014–4025, doi:10.1039/D0FO00195C.
7. Biswas, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 1–9, doi:10.1155/2016/5698931.
8. Niki, E. Oxidative Stress and Antioxidants: Distress or Eustress? *Arch Biochem Biophys* **2016**, *595*, 19–24, doi:10.1016/j.abb.2015.11.017.
9. Rahal, A.; Kumar, A.; Singh, V.; Yadav, B.; Tiwari, R.; Chakraborty, S.; Dhama, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1–19, doi:10.1155/2014/761264.
10. Hwang, K.-A.; Hwang, Y.-J.; Song, J. Antioxidant Activities and Oxidative Stress Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from *Cornus Officinalis* on Raw 264.7 Cells. *BMC Complement Altern Med* **2016**, *16*, 196, doi:10.1186/s12906-016-1172-3.
11. Tavafi, M. Diabetic Nephropathy and Antioxidants. *J Nephropathol* **2013**, *2*, 20–27, doi:10.5812/nephropathol.9093.
12. Lubos, E.; Handy, D.E.; Loscalzo, J. Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Atherothrombosis. *Front Biosci* **2008**, *13*, 5323–5344, doi:10.2741/3084.
13. Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C.B. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 13291–13295, doi:10.1074/jbc.R900010200.
14. Kim, N.Y.; Cheong, S.H.; Lee, K.J.; Sok, D.-E.; Kim, M.R. Anti-Inflammatory Effects of *Ribes Diacanthum* Pall Mediated via Regulation of Nrf2/HO-1 and NF-κB Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages and a TPA-Induced Dermatitis Animal Model. *Antioxidants* **2020**, *9*, 622, doi:10.3390/antiox9070622.
15. Zhang, Z.; Li, G.; Szeto, S.S.W.; Chong, C.M.; Quan, Q.; Huang, C.; Cui, W.; Guo, B.; Wang, Y.; Han, Y.; et al. Examining the Neuroprotective Effects of Protocatechuic Acid and Chrysin on in Vitro and in

- Vivo Models of Parkinson Disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *84*, 331–343, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.030.
16. Strimpakos, A.S.; Sharma, R.A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antioxidants & Redox Signaling* **2008**, *10*, 511–546, doi:10.1089/ars.2007.1769.
  17. Arisawa, T.; Tahara, T.; Shibata, T.; Nagasaka, M.; Nakamura, M.; Kamiya, Y.; Fujita, H.; Yoshioka, D.; Arima, Y.; Okubo, M.; et al. The Influence of Promoter Polymorphism of Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 Gene on the Aberrant DNA Methylation in Gastric Epithelium. *Oncol Rep* **2008**, doi:10.3892/or.19.1.211.
  18. Forman, H.J.; Dickinson, D.A. Oxidative Signaling and Glutathione Synthesis. *BioFactors* **2003**, *17*, 1–12, doi:10.1002/biof.5520170101.
  19. Park, E.-M.; Park, Y.-M.; Gwak, Y.-S. Oxidative Damage in Tissues of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Free Radical Biology and Medicine* **1998**, *25*, 79–86, doi:10.1016/S0891-5849(98)00041-0.
  20. Khansari, N.; Shakiba, Y.; Mahmoudi, M. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *IAD* **2009**, *3*, 73–80, doi:10.2174/187221309787158371.
  21. Willcox, J.K.; Ash, S.L.; Catignani, G.L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2004**, *44*, 275–295, doi:10.1080/10408690490468489.
  22. Cao; Chen; Ren; Zhang; Tan; Yang Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients* **2019**, *11*, 2794, doi:10.3390/nu11112794.
  23. Dilshara, M.G.; Lee, K.-T.; Kim, H.J.; Lee, H.-J.; Choi, Y.H.; Lee, C.-M.; Kim, L.K.; Kim, G.-Y. Anti-Inflammatory Mechanism of  $\alpha$ -Viniferin Regulates Lipopolysaccharide-Induced Release of Proinflammatory Mediators in BV2 Microglial Cells. *Cellular Immunology* **2014**, *290*, 21–29, doi:10.1016/j.cellimm.2014.04.009.
  24. Bigagli, E.; Cinci, L.; Paccosi, S.; Parenti, A.; D'Ambrosio, M.; Luceri, C. Nutritionally Relevant Concentrations of Resveratrol and Hydroxytyrosol Mitigate Oxidative Burst of Human Granulocytes and Monocytes and the Production of Pro-Inflammatory Mediators in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *International Immunopharmacology* **2017**, *43*, 147–155, doi:10.1016/j.intimp.2016.12.012.
  25. Thimmulappa, R.K. Nrf2 Is a Critical Regulator of the Innate Immune Response and Survival during Experimental Sepsis. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116*, 984–995, doi:10.1172/JCI25790.
  26. Qureshi, O.S.; Zheng, Y.; Nakamura, K.; Attridge, K.; Manzotti, C.; Schmidt, E.M.; Baker, J.; Jeffery, L.E.; Kaur, S.; Briggs, Z.; et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science* **2011**, *332*, 600–603, doi:10.1126/science.1202947.
  27. Lawrence, T.; Willoughby, D.A.; Gilroy, D.W. Anti-Inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. *Nat Rev Immunol* **2002**, *2*, 787–795, doi:10.1038/nri915.
  28. Funaro, A.; Wu, X.; Song, M.; Zheng, J.; Guo, S.; Rakariyatham, K.; Rodriguez-Estrada, M.T.; Xiao, H. Enhanced Anti-Inflammatory Activities by the Combination of Luteolin and Tangeretin: Enhanced Anti-Inflammatory Activities.... *Journal of Food Science* **2016**, *81*, H1320–H1327, doi:10.1111/1750-3841.13300.
  29. Landskron, G.; De La Fuente, M.; Thuwajit, P.; Thuwajit, C.; Hermoso, M.A. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research* **2014**, *2014*, 1–19, doi:10.1155/2014/149185.
  30. Zhang, L.; Wang, X.; Zhang, L.; Virgous, C.; Si, H. Combination of Curcumin and Luteolin Synergistically Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Vascular Inflammation in Human Vascular Cells and Mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2019**, *73*, 108222, doi:10.1016/j.jnutbio.2019.108222.
  31. Zhang, L.; Wang, X.; Si, H. Synergistic Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of the Combination of Resveratrol and Curcumin in Human Vascular Endothelial Cells and Rodent Aorta. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2022**, *108*, 109083, doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109083.
  32. De Sá Coutinho, D.; Pacheco, M.; Frozza, R.; Bernardi, A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. *IJMS* **2018**, *19*, 1812, doi:10.3390/ijms19061812.

33. Oray, M.; Abu Samra, K.; Ebrahimiadib, N.; Meese, H.; Foster, C.S. Long-Term Side Effects of Glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety* **2016**, *15*, 457–465, doi:10.1517/14740338.2016.1140743.
34. Barnes, P.J. Glucocorticoids. In *Chemical Immunology and Allergy*; Bergmann, K.-C., Ring, J., Eds.; S. Karger AG, 2014; Vol. 100, pp. 311–316 ISBN 978-3-318-02194-3.
35. James, M.W.; Hawkey, C.J. Assessment of Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Damage in the Human Gastrointestinal Tract. *Brit J Clinical Pharma* **2003**, *56*, 146–155, doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01934.x.
36. Benavente-García, O.; Castillo, J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6185–6205, doi:10.1021/jf8006568.
37. García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M.A.; Martínez, J.A. Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents: Implications in Cancer and Cardiovascular Disease. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 537–552, doi:10.1007/s00011-009-0037-3.
38. Ambriz-Pérez, D.L.; Leyva-López, N.; Gutierrez-Grijalva, E.P.; Heredia, J.B. Phenolic Compounds: Natural Alternative in Inflammation Treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture* **2016**, *2*, doi:10.1080/23311932.2015.1131412.
39. Santangelo, C.; Vañ, R.; Scazzocchio, B.; De Sancti, P.; Giovannini, C.; D'Archivio, M.; Masella, R. Anti-Inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *EMIDDT* **2017**, *18*, 36–50, doi:10.2174/1871530317666171114114321.
40. Li, T.; Li, F.; Liu, X.; Liu, J.; Li, D. Synergistic Anti-Inflammatory Effects of Quercetin and Catechin via Inhibiting Activation of TLR4-MyD88-Mediated NF-κB and MAPK Signaling Pathways: Synergistic Anti-Inflammatory Effects of Quercetin and Catechin. *Phytotherapy Research* **2019**, *33*, 756–767, doi:10.1002/ptr.6268.
41. Iacopini, P.; Baldi, M.; Storch, P.; Sebastiani, L. Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, in Vitro Antioxidant Activity and Interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 589–598, doi:10.1016/j.jfca.2008.03.011.
42. Tsao, R.; Yang, R. Optimization of a New Mobile Phase to Know the Complex and Real Polyphenolic Composition: Towards a Total Phenolic Index Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1018*, 29–40, doi:10.1016/j.chroma.2003.08.034.
43. Xiao, K.; Xuan, L.; Xu, Y.; Bai, D.; Zhong, D.; Wu, H.; Wang, Z.; Zhang, N. Dimeric Stilbene Glycosides from *Polygonum Cuspidatum*. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**.
44. Chen, Y.; Wei, X.; Xie, H.; Deng, H. Antioxidant 2-Phenylbenzofurans and a Coumestan from *Lespedeza Virgata*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 929–932, doi:10.1021/np800016e.
45. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine* **1996**, *20*, 933–956, doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9.
46. Biavatti, M.W. Synergy: An Old Wisdom, a New Paradigm for Pharmacotherapy. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2009**, *45*, 371–378, doi:10.1590/S1984-82502009000300002.
47. Bijnsdorp, I.V.; Giovannetti, E.; Peters, G.J. Analysis of Drug Interactions.
48. Fu, J.; Zhang, N.; Chou, J.H.; Dong, H.-J.; Lin, S.-F.; Ulrich-Merzenich, G.S.; Chou, T.-C. Drug Combination in Vivo Using Combination Index Method: Taxotere and T607 against Colon Carcinoma HCT-116 Xenograft Tumor in Nude Mice. *Synergy* **2016**, *3*, 15–30, doi:10.1016/j.synres.2016.06.001.
49. Peyrat-Maillard, M.N.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *J Amer Oil Chem Soc* **2003**, *80*, 1007, doi:10.1007/s11746-003-0812-z.
50. Bernal-Mercado, A.; Vazquez-Armenta, F.; Tapia-Rodriguez, M.; Islas-Osuna, M.; Mata-Haro, V.; Gonzalez-Aguilar, G.; Lopez-Zavala, A.; Ayala-Zavala, J. Comparison of Single and Combined Use of Catechin, Protocatechuic, and Vanillic Acids as Antioxidant and Antibacterial Agents against Uropathogenic *Escherichia Coli* at Planktonic and Biofilm Levels. *Molecules* **2018**, *23*, 2813, doi:10.3390/molecules23112813.

51. Park, C.M.; Jin, K.-S.; Lee, Y.-W.; Song, Y.S. Luteolin and Chicoric Acid Synergistically Inhibited Inflammatory Responses via Inactivation of PI3K-Akt Pathway and Impairment of NF- $\kappa$ B Translocation in LPS Stimulated RAW 264.7 Cells. *European Journal of Pharmacology* **2011**, *660*, 454–459, doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.007.
52. Chen, J.; Li, D.-L.; Xie, L.-N.; Ma, Y.; Wu, P.-P.; Li, C.; Liu, W.-F.; Zhang, K.; Zhou, R.-P.; Xu, X.-T.; et al. Synergistic Anti-Inflammatory Effects of Silibinin and Thymol Combination on LPS-Induced RAW264.7 Cells by Inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK Activation. *Phytomedicine* **2020**, *78*, 153309, doi:10.1016/j.phymed.2020.153309.
53. Csaki, C.; Mobasheri, A.; Shakibaei, M. Synergistic Chondroprotective Effects of Curcumin and Resveratrol in Human Articular Chondrocytes: Inhibition of IL-1 $\beta$ -Induced NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation and Apoptosis. *Arthritis Res Ther* **2009**, *11*, R165, doi:10.1186/ar2850.
54. Sharma, S.; Chopra, K.; Kulkarni, S.K.; Agrewala, J.N. Resveratrol and Curcumin Suppress Immune Response through CD28/CTLA-4 and CD80 Co-Stimulatory Pathway. *Clinical and Experimental Immunology* **2006**, *147*, 155–163, doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03257.x.
55. Wang, K.-T.; Chen, L.-G.; Tseng, S.-H.; Huang, J.-S.; Hsieh, M.-S.; Wang, C.-C. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol and Oligostilbenes from *Vitis Thunbergii* Var. *Taiwaniana* against Lipopolysaccharide-Induced Arthritis. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3649–3656, doi:10.1021/jf104718g.
56. Güran, M.; Şanlıtürk, G.; Kerküklü, N.R.; Altundağ, E.M.; Süha Yalçın, A. Combined Effects of Quercetin and Curcumin on Anti-Inflammatory and Antimicrobial Parameters in Vitro. *European Journal of Pharmacology* **2019**, *859*, 172486, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172486.
57. Liu, B.; Li, S.; Sui, X.; Guo, L.; Liu, X.; Li, H.; Gao, L.; Cai, S.; Li, Y.; Wang, T.; et al. Root Extract of *Polygonum Cuspidatum* Siebold & Zucc. Ameliorates DSS-Induced Ulcerative Colitis by Affecting NF-kappaB Signaling Pathway in a Mouse Model via Synergistic Effects of Polydatin, Resveratrol, and Emodin. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 347, doi:10.3389/fphar.2018.00347.
58. Agah, S.; Kim, H.; Mertens-Talcott, S.U.; Awika, J.M. Complementary Cereals and Legumes for Health: Synergistic Interaction of Sorghum Flavones and Cowpea Flavonols against LPS-Induced Inflammation in Colonic Myofibroblasts. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1600625, doi:10.1002/mnfr.201600625.
59. Mok, J.Y.; Jeong, S.I.; Kim, J.H.; Jang, S.I. Synergic Effect of Quercetin and Astragaloside from Mulberry Leaves on Anti-Inflammation. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, *25*(5), 830–836.
60. Zhao, L.; Cen, F.; Tian, F.; Li, M.-J.; Zhang, Q.; Shen, H.; Shen, X.-C.; Zhou, M.; Du, J. Combination Treatment with Quercetin and Resveratrol Attenuates High Fat Diet-induced Obesity and Associated Inflammation in Rats via the AMPK $\alpha$ 1/SIRT1 Signaling Pathway. *Exp Ther Med* **2017**, doi:10.3892/etm.2017.5331.
61. Vazquez Prieto, M.A.; Bettaieb, A.; Rodriguez Lanzi, C.; Soto, V.C.; Perdicaro, D.J.; Galmarini, C.R.; Haj, F.G.; Miatello, R.M.; Oteiza, P.I. Catechin and Quercetin Attenuate Adipose Inflammation in Fructose-fed Rats and 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular Nutrition Food Res* **2015**, *59*, 622–633, doi:10.1002/mnfr.201400631.
62. Freeman, B.L.; Eggett, D.L.; Parker, T.L. Synergistic and Antagonistic Interactions of Phenolic Compounds Found in Navel Oranges. *Journal of Food Science* **2010**, *75*, C570–C576, doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01717.x.
63. Palafox-Carlos, H.; Gil-Chávez, J.; Sotelo-Mundo, R.; Namiesnik, J.; Gorinstein, S.; González-Aguilar, G. Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules* **2012**, *17*, 12657–12664, doi:10.3390/molecules171112657.
64. Kurin, E.; Mučaji, P.; Nagy, M. In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study. *Molecules* **2012**, *17*, 14336–14348, doi:10.3390/molecules171214336.
65. Gojak-Salimović, S.; Ramić Investigation of the Antioxidant Synergisms and Antagonisms among Caffeic, Ferulic and Rosmarinic Acids Using the Briggs-Rauscher Reaction Method. *Glas. hem. tehnol. Bosne Herceg.* **2020**, doi:10.35666/ghtbh.2020.54.05.

66. Capitani, C.D.; Carvalho, A.C.L.; Botelho, P.B.; Carrapeiro, M.M.; Castro, I.A. Synergism on Antioxidant Activity between Natural Compounds Optimized by Response Surface Methodology. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 1100–1110, doi:10.1002/ejlt.200800258.
67. Mikstacka, R.; Rimando, A.M.; Ignatowicz, E. Antioxidant Effect of Trans-Resveratrol, Pterostilbene, Quercetin and Their Combinations in Human Erythrocytes In Vitro. *Plant Foods Hum Nutr* **2010**, *65*, 57–63, doi:10.1007/s11130-010-0154-8.
68. Chu, C.; Lu, F.-J.; Yeh, R.-H.; Li, Z.-L.; Chen, C.-H. Synergistic Antioxidant Activity of Resveratrol with Genistein in High-Glucose Treated Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Biomedical Reports* **2016**, *4*, 349–354, doi:10.3892/br.2016.573.
69. Conte, A.; Pellegrini, S.; Tagliazucchi, D. Synergistic Protection of PC12 Cells from  $\beta$ -Amyloid Toxicity by Resveratrol and Catechin. *Brain Research Bulletin* **2003**, *62*, 29–38, doi:10.1016/j.brainresbull.2003.08.001.
70. Zhou, X.; Afzal, S.; Zheng, Y.-F.; Münch, G.; Li, C.G. Synergistic Protective Effect of Curcumin and Resveratrol against Oxidative Stress in Endothelial EAhy926 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, *2021*, 1–13, doi:10.1155/2021/2661025.
71. Wang, C.; Sun, Y.; Liu, W.; Liu, Y.; Afzal, S.; Grover, J.; Chang, D.; Münch, G.; Li, C.G.; Lin, S.; et al. Protective Effect of the Curcumin-Baicalein Combination against Macrovascular Changes in Diabetic Angiopathy. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 953305, doi:10.3389/fendo.2022.953305.
72. Cheng, Y.; Zhao, J.; Tse, H.F.; Le, X.C.; Rong, J. Plant Natural Products Calycosin and Gallic Acid Synergistically Attenuate Neutrophil Infiltration and Subsequent Injury in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction: A Possible Role for Leukotriene B4 12-Hydroxydehydrogenase? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, *2015*, 1–12, doi:10.1155/2015/434052.
73. AlBasher, G.; Abdel-Daim, M.M.; Almeer, R.; Ibrahim, K.A.; Hamza, R.Z.; Bungau, S.; Aleya, L. Synergistic Antioxidant Effects of Resveratrol and Curcumin against Fipronil-Triggered Oxidative Damage in Male Albino Rats. *Environ Sci Pollut Res* **2020**, *27*, 6505–6514, doi:10.1007/s11356-019-07344-8.
74. Aftab, N.; Vieira, A. Antioxidant Activities of Curcumin and Combinations of This Curcuminoid with Other Phytochemicals. *Phytother. Res.* **2009**, n/a-n/a, doi:10.1002/ptr.2960.
75. Heeba, G.H.; Mahmoud, M.E.; Hanafy, A.A.E. Anti-Inflammatory Potential of Curcumin and Quercetin in Rats: Role of Oxidative Stress, Heme Oxygenase-1 and TNF- $\alpha$ . *Toxicol Ind Health* **2014**, *30*, 551–560, doi:10.1177/0748233712462444.
76. Majumdar, A.P.N.; Banerjee, S.; Nautiyal, J.; Patel, B.B.; Patel, V.; Du, J.; Yu, Y.; Elliott, A.A.; Levi, E.; Sarkar, F.H. Curcumin Synergizes With Resveratrol to Inhibit Colon Cancer. *Nutrition and Cancer* **2009**, *61*, 544–553, doi:10.1080/01635580902752262.
77. Kausar, H.; Jeyabalan, J.; Aqil, F.; Chabba, D.; Sidana, J.; Singh, I.P.; Gupta, R.C. Berry Anthocyanidins Synergistically Suppress Growth and Invasive Potential of Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Letters* **2012**, *325*, 54–62, doi:10.1016/j.canlet.2012.05.029.
78. Kowalczyk, M.C.; Kowalczyk, P.; Tolstykh, O.; Hanausek, M.; Walaszek, Z.; Slaga, T.J. Synergistic Effects of Combined Phytochemicals and Skin Cancer Prevention in SENCAR Mice. *Cancer Prevention Research* **2010**, *3*, 170–178, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0196.
79. Iovine, B.; Iannella, M.L.; Gasparri, F.; Monfrecola, G.; Bevilacqua, M.A. Synergic Effect of Genistein and Daidzein on UVB-Induced DNA Damage: An Effective Photoprotective Combination. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, *2011*, 1–8, doi:10.1155/2011/692846.
80. Kim, A.; Yun, J.-M. Combination Treatments with Luteolin and Fisetin Enhance Anti-Inflammatory Effects in High Glucose-Treated THP-1 Cells Through Histone Acetyltransferase/Histone Deacetylase Regulation. *Journal of Medicinal Food* **2017**, *20*, 782–789, doi:10.1089/jmf.2017.3968.
81. Liu, J.; Huang, H.; Huang, Z.; Ma, Y.; Zhang, L.; He, Y.; Li, D.; Liu, W.; Goodin, S.; Zhang, K.; et al. Eriocitrin in Combination with Resveratrol Ameliorates LPS-Induced Inflammation in RAW264.7 Cells and Relieves TPA-Induced Mouse Ear Edema. *Journal of Functional Foods* **2019**, *56*, 321–332, doi:10.1016/j.jff.2019.03.008.
82. Xu, B.; Huang, S.; Chen, Y.; Wang, Q.; Luo, S.; Li, Y.; Wang, X.; Chen, J.; Luo, X.; Zhou, L. Synergistic Effect of Combined Treatment with Baicalin and Emodin on DSS -induced Colitis in Mouse. *Phytotherapy Research* **2021**, *35*, 5708–5719, doi:10.1002/ptr.7230.

83. Vasileva, L.V.; Saracheva, K.E.; Ivanovska, M.V.; Petrova, A.P.; Marchev, A.S.; Georgiev, M.I.; Murdjeva, M.A.; Getova, D.P. Antidepressant-like Effect of Salidroside and Curcumin on the Immunoreactivity of Rats Subjected to a Chronic Mild Stress Model. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *121*, 604–611, doi:10.1016/j.fct.2018.09.065.
84. Matacchione, G.; Valli, D.; Silvestrini, A.; Giuliani, A.; Sabbatinelli, J.; Giordani, C.; Coppari, S.; Rippon, M.R.; Albertini, M.C.; Olivieri, F. Curcumin, Polydatin and Quercetin Synergistic Activity Protects from High-Glucose-Induced Inflammation and Oxidative Stress. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1037, doi:10.3390/antiox11061037.
85. Tomé-Carneiro, J.; González, M.; Larrosa, M.; García-Almagro, F.J.; Avilés-Plaza, F.; Parra, S.; Yáñez-Gascón, M.J.; Ruiz-Ros, J.A.; García-Conesa, M.T.; Tomás-Barberán, F.A.; et al. Consumption of a Grape Extract Supplement Containing Resveratrol Decreases Oxidized LDL and Apo B in Patients Undergoing Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Triple-blind, 6-month Follow-up, Placebo-controlled, Randomized Trial. *Molecular Nutrition Food Res* **2012**, *56*, 810–821, doi:10.1002/mnfr.201100673.
86. Bisht, A.; Dickens, M.; Rutherford-Markwick, K.; Thota, R.; Mutukumira, A.N.; Singh, H. Chlorogenic Acid Potentiates the Anti-Inflammatory Activity of Curcumin in LPS-Stimulated THP-1 Cells. *Nutrients* **2020**, *12*, 2706, doi:10.3390/nu12092706.
87. Corrêa, M.G.; Pires, P.R.; Ribeiro, F.V.; Pimentel, S.Z.; Casarin, R.C.V.; Cirano, F.R.; Tenenbaum, H.T.; Casati, M.Z. Systemic Treatment with Resveratrol and/or Curcumin Reduces the Progression of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodont Res* **2017**, *52*, 201–209, doi:10.1111/jre.12382.
88. Harasstani, O.A.; Moin, S.; Tham, C.L.; Liew, C.Y.; Ismail, N.; Rajajendram, R.; Harith, H.H.; Zakaria, Z.A.; Mohamad, A.S.; Sulaiman, M.R.; et al. Flavonoid Combinations Cause Synergistic Inhibition of Proinflammatory Mediator Secretion from Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Cells. *Inflamm. Res.* **2010**, *59*, 711–721, doi:10.1007/s00011-010-0182-8.
89. Hong, S.; Dia, V.P.; Zhong, Q. Synergistic Anti-Inflammatory Activity of Apigenin and Curcumin Co-Encapsulated in Caseins Assessed with Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *193*, 702–712, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.10.153.
90. Liu, L.-L.; Liu, Q.; Li, P.; Liu, E.-H. Discovery of Synergistic Anti-Inflammatory Compound Combination from Herbal Formula GuGe FengTong Tablet. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2018**, *16*, 683–692, doi:10.1016/S1875-5364(18)30108-0.
91. Lou, L.; Liu, Y.; Zhou, J.; Wei, Y.; Deng, J.; Dong, B.; Chai, L. Chlorogenic Acid and Luteolin Synergistically Inhibit the Proliferation of Interleukin-1  $\beta$  -Induced Fibroblast-like Synoviocytes through Regulating the Activation of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT-Signaling Pathways. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **2015**, *37*, 499–507, doi:10.3109/08923973.2015.1095763.
92. Mukherjee, S.; Debata, P.R.; Hussaini, R.; Chatterjee, K.; Baidoo, J.N.E.; Sampat, S.; Szerszen, A.; Navarra, J.P.; Fata, J.; Severinova, E.; et al. Unique Synergistic Formulation of Curcumin, Epicatechin Gallate and Resveratrol, Tricurin, Suppresses HPV E6, Eliminates HPV+ Cancer Cells, and Inhibits Tumor Progression. *Oncotarget* **2017**, *8*, 60904–60916, doi:10.18632/oncotarget.16648.
93. Murakami, A.; Takahashi, D.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H. Synergistic Suppression of Superoxide and Nitric Oxide Generation from Inflammatory Cells by Combined Food Factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *523–524*, 151–161, doi:10.1016/S0027-5107(02)00331-7.
94. Vivancos, M.; Moreno, J.J. Effect of Resveratrol, Tyrosol and  $\beta$ -Sitosterol on Oxidised Low-Density Lipoprotein-Stimulated Oxidative Stress, Arachidonic Acid Release and Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthesis by RAW 264.7 Macrophages. *Br J Nutr* **2008**, *99*, 1199–1207, doi:10.1017/S0007114507876203.
95. Abraham, S.K.; Eckhardt, A.; Oli, R.G.; Stopper, H. Analysis of in Vitro Chemoprevention of Genotoxic Damage by Phytochemicals, as Single Agents or as Combinations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2012**, *744*, 117–124, doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.011.



96. Aftab, N.; Likhitwitayawuid, K.; Vieira, A. Comparative Antioxidant Activities and Synergism of Resveratrol and Oxyresveratrol. *Natural Product Research* **2010**, *24*, 1726–1733, doi:10.1080/14786410902990797.
97. Chen, W.; Zou, M.; Ma, X.; Lv, R.; Ding, T.; Liu, D. Co-Encapsulation of EGCG and Quercetin in Liposomes for Optimum Antioxidant Activity. *Journal of Food Science* **2018**, 1750-3841.14405, doi:10.1111/1750-3841.14405.
98. Habza-Kowalska, E.; Kaczor, A.A.; Bartuzi, D.; Pilat, J.; Gawlik-Dziki, U. Some Dietary Phenolic Compounds Can Activate Thyroid Peroxidase and Inhibit Lipoxigenase-Preliminary Study in the Model Systems. *IJMS* **2021**, *22*, 5108, doi:10.3390/ijms22105108.
99. Hajimehdipoor, H.; Shahrestani, R.; Shekarchi, M. Investigating the Synergistic Antioxidant Effects of Some Flavonoid and Phenolic Compounds. *7*.
100. Joshi, T.; Deepa, P.R.; Sharma, P.K. Effect of Different Proportions of Phenolics on Antioxidant Potential: Pointers for Bioactive Synergy/Antagonism in Foods and Nutraceuticals. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* **2022**, *92*, 939–946, doi:10.1007/s40011-022-01396-6.
101. Liu, Z.; Luo, Z.; Jia, C.; Wang, D.; Li, D. Synergistic Effects of *Potentilla Fruticosa* L. Leaves Combined with Green Tea Polyphenols in a Variety of Oxidation Systems: Synergistic Effects of PEF with GTP.... *Journal of Food Science* **2016**, *81*, C1091–C1101, doi:10.1111/1750-3841.13292.
102. Liu, T.; Liu, M.; Liu, H.; Ren, Y.; Zhao, Y.; Yan, H.; Wang, Q.; Zhang, N.; Ding, Z.; Wang, Z. Co-Encapsulation of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate and Piceatannol/Oxyresveratrol in  $\beta$ -Lactoglobulin: Effect of Ligand–Protein Binding on the Antioxidant Activity, Stability, Solubility and Cytotoxicity. *Food Funct.* **2021**, *12*, 7126–7144, doi:10.1039/D1FO00481F.
103. Liu, H.; Wang, D.; Ren, Y.; Wang, L.; Weng, T.; Liu, J.; Wu, Y.; Ding, Z.; Liu, M. Multispectroscopic and Synergistic Antioxidant Study on the Combined Binding of Caffeic Acid and (–)-Epicatechin Gallate to Lysozyme. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2022**, *272*, 120986, doi:10.1016/j.saa.2022.120986.
104. Naksuriya, O.; Okonogi, S. Comparison and Combination Effects on Antioxidant Power of Curcumin with Gallic Acid, Ascorbic Acid, and Xanthone. *DD&T* **2015**, *9*, 136–141, doi:10.5582/ddt.2015.01013.
105. Nantitanon, W. Comparison of Antioxidant Activity of Compounds Isolated from Guava Leaves and a Stability Study of the Most Active Compound. *Drug Discov Ther* **2012**, doi:10.5582/ddt.2012.v6.1.38.
106. Salazar-López, N.J.; González-Aguilar, G.A.; Loarca-Piña, G.; Cinco-Moroyoqui, F.J.; Rouzaud-Sández, O.; Domínguez-Avila, J.A.; Robles-Sánchez, M. Contribution and Interactions of Hydroxycinnamic Acids Found in Bran and Wholegrain Sorghum (*Sorghum Bicolor* L. Moench): Effects on the Antioxidant Capacity and Inhibition of Human Erythrocyte Hemolysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, *2017*, 1–8, doi:10.1155/2017/8219023.
107. Slavova-Kazakova, A.; Janiak, M.A.; Sulewska, K.; Kancheva, V.D.; Karamać, M. Synergistic, Additive, and Antagonistic Antioxidant Effects in the Mixtures of Curcumin with (–)-Epicatechin and with a Green Tea Fraction Containing (–)-Epicatechin. *Food Chemistry* **2021**, *360*, 129994, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129994.
108. Wang, F.; Zhao, S.; Li, F.; Zhang, B.; Qu, Y.; Sun, T.; Luo, T.; Li, D. Investigation of Antioxidant Interactions between Radix Astragali and Cimicifuga Foetida and Identification of Synergistic Antioxidant Compounds. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87221, doi:10.1371/journal.pone.0087221.
109. Baranowska, M.; Koziara, Z.; Suliborska, K.; Chrzanowski, W.; Wormstone, M.; Namieśnik, J.; Bartoszek, A. Interactions between Polyphenolic Antioxidants Quercetin and Naringenin Dictate the Distinctive Redox-Related Chemical and Biological Behaviour of Their Mixtures. *Sci Rep* **2021**, *11*, 12282, doi:10.1038/s41598-021-89314-0.
110. Hisamura, F.; Kojima-Yuasa, A.; Huang, X.; Kennedy, D.O.; Matsui-Yuasa, I. Synergistic Effect of Green Tea Polyphenols on Their Protection Against FK506-Induced Cytotoxicity in Renal Cells. *Am. J. Chin. Med.* **2008**, *36*, 615–624, doi:10.1142/S0192415X08006028.
111. Li, H.; He, H.; Liu, C.; Akanji, T.; Gutkowski, J.; Li, R.; Ma, H.; Wan, Y.; Wu, P.; Li, D.; et al. Dietary Polyphenol Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol Are Moderate Skin Permeable Elastase and Collagenase Inhibitors with Synergistic Cellular Antioxidant Effects in Human Skin Fibroblasts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **2022**, *73*, 460–470, doi:10.1080/09637486.2021.1996542.

112. Redondo, A.; Estrella, N.; Lorenzo, A.G.; Cruzado, M.; Castro, C. Quercetin and Catechin Synergistically Inhibit Angiotensin II-Induced Redox-Dependent Signalling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells from Hypertensive Rats. *Free Radical Research* **2012**, *46*, 619–627, doi:10.3109/10715762.2012.660527.
113. Yang, S.-Y.; Hong, C.-O.; Lee, G.P.; Kim, C.-T.; Lee, K.-W. The Hepatoprotection of Caffeic Acid and Rosmarinic Acid, Major Compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-Induced Oxidative Liver Damage. *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *55*, 92–99, doi:10.1016/j.fct.2012.12.042.
114. Abdel-Diam, M.M.; Samak, D.H.; El-Sayed, Y.S.; Aleya, L.; Alarifi, S.; Alkahtani, S. Curcumin and Quercetin Synergistically Attenuate Subacute Diazinon-Induced Inflammation and Oxidative Neurohepatic Damage, and Acetylcholinesterase Inhibition in Albino Rats. *Environ Sci Pollut Res* **2019**, *26*, 3659–3665, doi:10.1007/s11356-018-3907-9.
115. Al-Salih, R.M.H. Clinical Experimental Evidence: Synergistic Effect of Gallic Acid and Tannic Acid as Antidiabetic and Antioxidant Agents. 11.
116. Altındağ, F.; Özdek, U. Synergistic Effects of Sinapic Acid and Ellagic Acid Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy by Inhibiting Apoptosis, DNA Damage, and Structural Deterioration in Rats. *Hum Exp Toxicol* **2021**, *40*, S290–S299, doi:10.1177/09603271211040825.
117. El-Sayed, E.-S.M.; Mansour, A.M.; Abdul-Hameed, M.S. Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats: THYMOL AND CARVACROL PREVENT DOXORUBICIN CARDIOTOXICITY. *J Biochem Mol Toxicol* **2016**, *30*, 37–44, doi:10.1002/jbt.21740.
118. Hassan, S.M.; Khalaf, M.M.; Sadek, S.A.; Abo-Youssef, A.M. Protective Effects of Apigenin and Myricetin against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Pharmaceutical Biology* **2017**, *55*, 766–774, doi:10.1080/13880209.2016.1275704.

## II. Les stilbènes

Les stilbénoides comprennent les stilbènes, les dihydrostilbènes, les phénanthrènes, les 9,10-dihydrophénanthrènes et les composés apparentés (Figure 3).

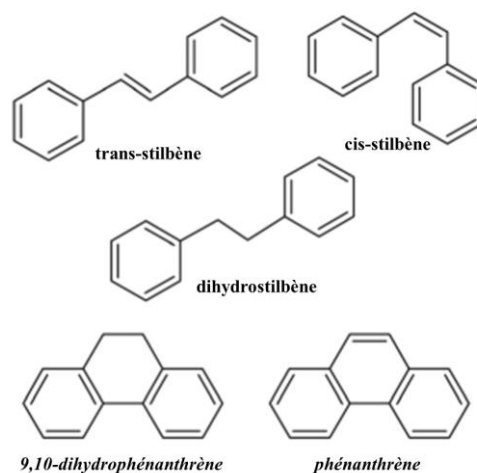


Figure 3: Principales structures des stilbénoides, modifiée de Rivière et al. (2012).

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons aux stilbènes, en tant que représentants des stilbénoides les plus étudiés pour les activités biologiques.

Les stilbènes, nommés d'après le mot grec « stilbos », qui signifie « brillant », constituent un groupe de polyphénols très bien représentés dans les plantes. En effet, ils sont présents dans une cinquantaine de familles botaniques et on les trouve plus particulièrement en abondance chez les Gnetaceae, Pinaceae, Cyperaceae, Fabaceae, Dipterocarpaceae et Vitaceae (Rivière et al., 2012).

Au total 459 stilbènes provenant de 45 familles de plantes et de 196 espèces ont été identifiés (Teka, 2022). La famille des Vitaceae, dont l'espèce la plus connue est *Vitis vinifera*, constitue la source la plus importante en stilbènes (Rivière et al., 2012).

La fonction principale des stilbènes dans les plantes est d'agir comme phytoalexines à la suite de stress biotiques (infections fongiques ou bactériennes et attaques d'insectes), ou de stress abiotiques (irradiation excessive aux ultraviolets, exposition aux températures élevées et oxydation) (Rivière et al., 2012; Jeandet et al., 2010; Langcake and Pryce, 1977; Xiao et al., 2008).

## II.1. Biosynthèse des stilbènes

Les stilbènes dérivent de la voie générale des phénylpropanoïdes (Rivière et al., 2012) avec comme point de départ, la synthèse de l'acide *p*-coumarique à partir d'acides aminés aromatiques (phénylalanine ou tyrosine) (Yu & Jez, 2008). Celui-ci est alors ensuite estérifié par la 4-coumaroyl CoA-ligase (CL), pour donner le *p*-coumaroyl-CoA (voie shikimate). Le *p*-coumaroyl-CoA subit une série de condensation répétée avec trois molécules malonyl-CoA issues de la voie acétate, donnant naissance à une chaîne polycétide (Austin & Noel, 2003). Le polycétide résultant, est ensuite utilisé dans la synthèse des flavonoïdes ou des stilbénoides, selon l'enzyme impliquée, à savoir, la chalcone synthase (CHS) ou la stilbène synthase (STS), respectivement (Rivière et al., 2012).

Dans le cas des stilbènes, la STS catalyse le repliement et la cyclisation par une réaction de condensation d'aldol à partir du polycétide intermédiaire afin de générer le squelette de base des stilbènes : le resvératrol (Figure 4). Diverses réactions telles que l'hydroxylation, la glycosylation, la méthylation, la déshydroxylation et la prénylation donnent ensuite naissance à un grand nombre de dérivés de stilbénoides (Dubrovina & Kiselev, 2017).

Les monomères obtenus peuvent potentiellement subir à leur tour une oligomérisation par couplage oxydatif de radicaux phénoxy généré par oxydation afin de donner des oligomères (Langcake & Pryce, 1977; Shen et al., 2009).

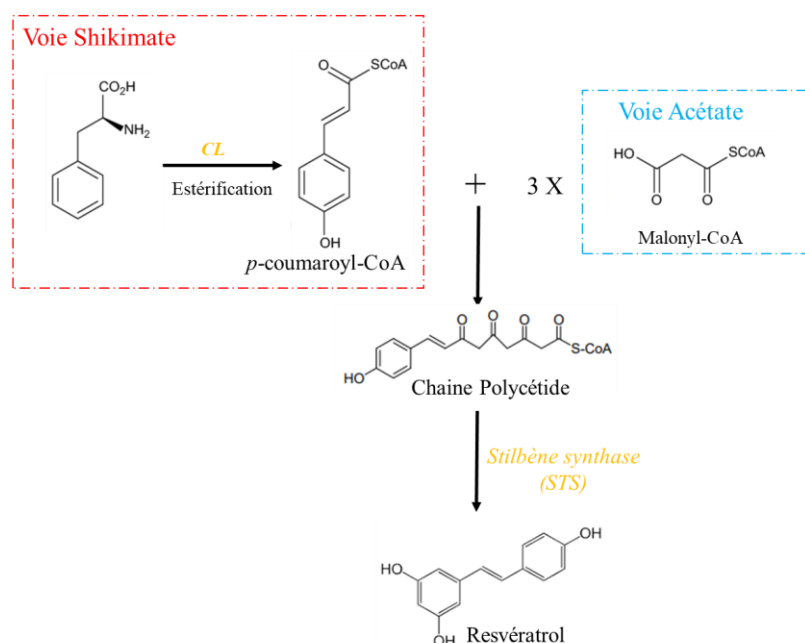


Figure 4: Voie de biosynthèse des stilbènes.

Les stilbènes sont caractérisés par un squelette C6-C2-C6 (1,2-diphényléthylène), défini par deux cycles aromatiques (A et B) liés par un pont éthylène. Les stilbènes existent sous deux formes diastéréoisomères : E-1,2-diphényléthylène, configuration *trans* qui est la plus stable et Z-1,2-diphényléthylène configuration *cis* (Rivière et al., 2012; Shen et al., 2009). L'isomérisation du *trans*-stilbène en *cis*-stilbène se produit sous l'influence de la lumière, tandis que le passage de la forme *cis*-stilbène à la forme *trans*-stilbène est induit par la chaleur ou par la lumière.

Le resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène) qui est la molécule de base des stilbènes peut être sujette à des modifications donnant lieu à un large éventail de composés. Ces modifications comprennent le nombre et la position des fonctions hydroxyles, diverses substitutions, et divers schémas d'oligomérisation (Rivière et al., 2012). Concernant les phénomènes de substitutions, les groupes hydroxyles des cycles aromatiques peuvent être substitués par des sucres pour donner des dérivés glycosylés (picéide), par des groupements méthyles pour donner des formes méthylées (ptérostilbène), par des groupements prényls pour donner les formes prénylées (arachidines) (Figure 5)

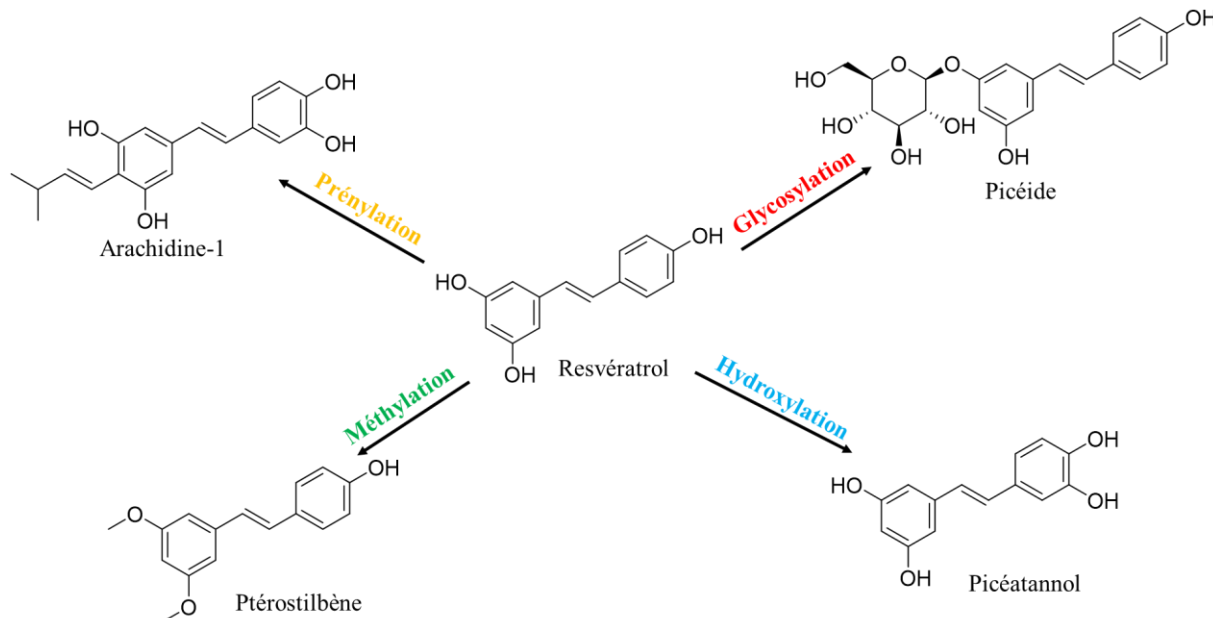


Figure 5: Principales substitutions du resvératrol, donnant différents monomères.

L'oligomérisation permet la formation de stilbènes complexes, allant des dimères jusqu'aux octamères. Les oligomères de stilbènes sont des composés issus du couplage oxydatif d'unités monomériques comme le resvératrol, l'oxyresvératrol, le picéatannol, le ptérostilbène par des liaisons C–C ou C–O–C. Les oligomères peuvent être homogènes, c'est-à-dire issus du couplage des mêmes unités monomériques ou hétérogènes c'est-à-dire issus du couplage d'unités différentes.

Parmi les oligostilbènes, les oligomères de resvératrol constituent le groupe le plus important. À ce jour, plus de 300 oligomères de resvératrol, contenant deux à huit unités de resvératrol, ont été caractérisés (Keylor et al., 2015).

Les réactions de couplage entre deux molécules de resvératrol peuvent se faire selon trois orientations régio-isomériques différentes à savoir les couplages 3 – 8', 8 – 8' et 8 – 10'. Le couplage 8 – 10' reste le plus courant, notamment chez les Vitacées. Il est admis que la dimérisation du resvératrol se produit généralement à travers le couplage régio-isomérique 8–10' pour donner l' $\epsilon$ -viniférine qui est considéré comme l'intermédiaire majeur au sein des espèces *Vitis*, dont est issu un grand nombre d'oligomères plus complexes (Keylor et al., 2015). Un schéma hypothétique de la formation de l' $\epsilon$ -viniférine est présenté dans la figure 6. La dimérisation du resvératrol implique dans un premier temps le passage à l'état radicalaire par oxydation, c'est-à-dire la formation d'un radical phénoxy, qui se délocalise en raison de la forte conjugaison du noyau stilbénoloïde et peut être stabilisé en position 3, 8 ou 10. Les deux radicaux vont alors subir un couplage entre les carbones 8 et 10', pour former un intermédiaire *para*-quinone méthide très réactif qui subira alors des réactions de cyclisation intramoléculaire de Friedel-Crafts pour donner l' $\epsilon$ -viniférine.

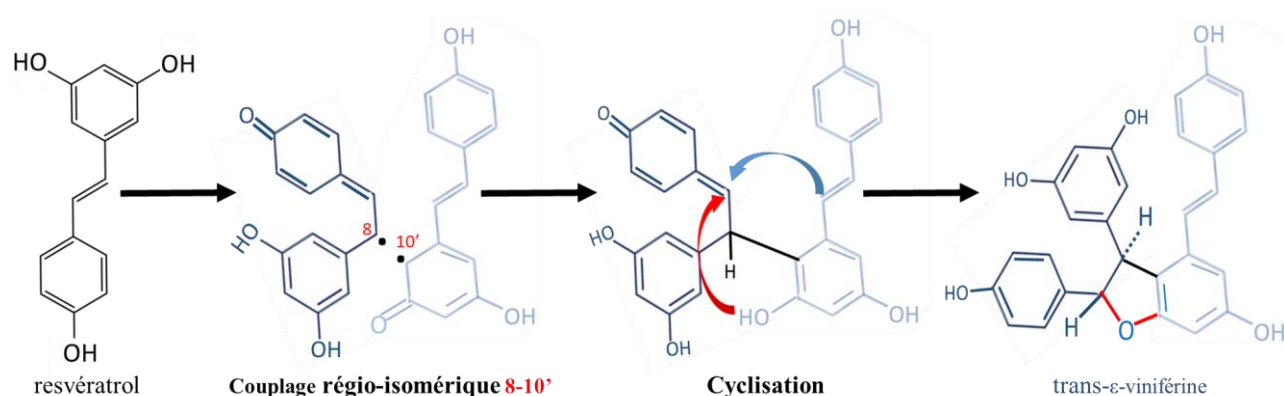


Figure 6: Mécanismes hypothétiques de la dimérisation du resvératrol menant à la formation de l' $\epsilon$ -viniférine (d'après Keylor et al., 2015, modifié).

Un processus similaire est impliqué dans la formation de stilbènes hautement polymérisés, par exemple deux dimères peuvent se condenser pour former un tétramère. C'est le cas de la vitisine B qui peut être synthétisée par le couplage oxydatif de deux molécules d' $\epsilon$ -viniférine (Keylor et al., 2015).

Le resvératrol, unité de base de la majorité des stilbènes subit un processus d'oligomérisation allant du dimère (l' $\epsilon$ -viniférine) à l'octamère, le vateriaphénol A qui représente à ce jour le plus haut degré d'oligomérisation du resvératrol (Figure 7) :

- les **dimères de resvératrol** représentent le groupe des oligomères dans lequel on trouve la plus grande diversité de composés, comme l' $\epsilon$ -viniférine, la  $\delta$ -viniférine, ou le pallidol.  
L' $\epsilon$ -viniférine, principal composé de l'espèce *Vitis*, est un intermédiaire important en raison de son implication dans la biosynthèse des autres oligomères (Keylor et al., 2015; Rivière et al., 2012).
- les **trimères de resvératrol**, tels que l' $\alpha$ -viniférine, le miyabenol C, la gnétine H peuvent être formés à partir de trois unités monomériques de resvératrol ou d'une unité de resvératrol et une d' $\epsilon$ -viniférine.
- les **tétramères de resvératrol** sont composés de molécules qui contiennent majoritairement une fraction benzofurane, puisque ce sont principalement des "dimères de dimères" : l'hopéaphénol, la vitisine A (R2-viniférine) et la vitisine B (r-viniférine).
- Un exemple de **pentamère du resvératrol** est l'amurensine F, une molécule résultant du couplage de l'amurensine D avec l' $\epsilon$ -viniférine.
- les **hexamères du resvératrol** connus à ce jour sont le viniphénol A et l'upunaphénol A.
- l'**heptamère** de resvératrol connu à ce jour est le pauciflorol D.
- l'**octamère** de resvératrol, le vateriaphénol A est à ce jour la molécule ayant le plus haut degré de polymérisation de tous les oligomères de resvératrol (Shen et al., 2008).

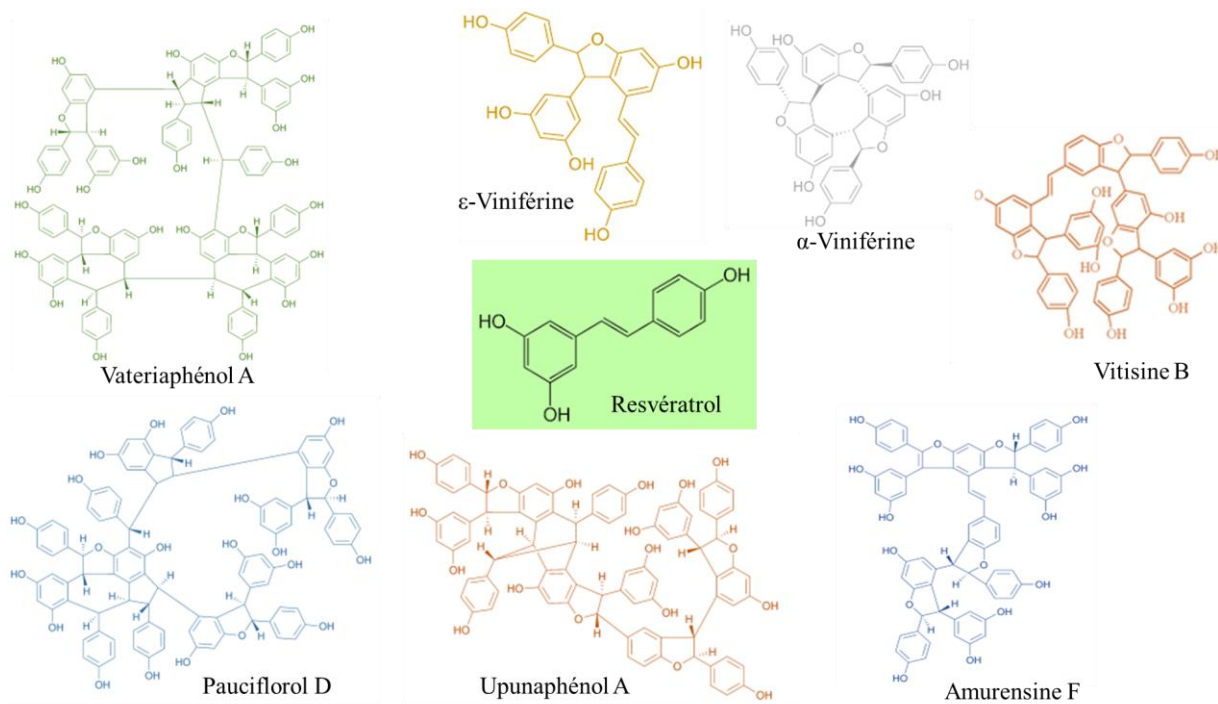


Figure 7: Exemples de structures des oligomères du resvératrol.

Certains oligomères peuvent être hétérogènes, c'est-à-dire formés à partir des unités monomériques différentes, tels que le resvératrol et l'oxyresvératrol, le resvératrol et le picéatannol. Les espèces du genre *Gnetum* (*Gnetaceae*) sont connus pour être de riches sources en oligostilbènes hétérogènes. Par exemple la gnétupendine C et gnétine D sont des dimères issus du couplage oxydatif entre le resvératrol et l'oxyresvératrol. La gnétumontanine B et les gnétines J–K sont des trimères issus de deux unités d'oxyresvératrol et d'une unité resvératrol. Le gnémonol C ou macrostachyol A sont deux tétramères issus du couplage oxydatif entre trois unités de resvératrol et une unité d'oxyresvératrol. Le longusol A et le latifolol sont des dimères et trimères de resvératrol et de picéatannol (Rivière et al., 2012; Shen et al., 2009).

## II.2. Sources et apports alimentaires en stilbènes

La littérature actuelle montre qu'il existe plus de 400 stilbènes naturels, cependant la présence de stilbènes dans l'alimentation humaine est limitée à quelques aliments comme le raisin, le vin rouge, l'arachide et certains types de baies (Khawand et al., 2018).



### II.2.1. Les stilbènes de la vigne

Il existe environ 10 000 variétés de *Vitis vinifera* (vigne), qui sont plantées dans de nombreux pays avec des zones de culture à grande échelle en Europe, en Amérique, au Moyen-Orient et en Asie (Sharafan et al., 2023). C'est la plus grande culture fruitière au monde avec une production annuelle d'environ 75 millions de tonnes, dont l'Europe est le plus grand producteur (environ 41%), suivie de l'Asie (29%) et les Amériques (21%) (Colombo et al., 2019).

La vigne, appartenant à la famille des Vitaceae, contient de nombreux composés phénoliques dont les stilbènes. La vigne, consommée sous forme de raisin, de jus de raisin et de vin, est la principale source alimentaire de stilbènes (Duarte et al., 2020).

Dans le raisin et dans le vin, Pawlus et al. (2012) ont identifié des monomères et oligomères tels que le resvératrol, le picéide, le picéatannol, l'astringine et le ptérostilbène, le pallidol, les viniférines et les vitisines. La teneur en stilbènes varie selon les cépages. Par exemple, une étude récente de Benbouguerra et al. (2021) ayant comparé la teneur en stilbènes dans trois cépages la Syrah, le Merlot et le Tannat a rapporté des valeurs respectives de 107,63 mg/kg, 24,11 mg/kg et 8,17 mg/kg de pellicule. Le picéide, une forme glycosylée du resvératrol, représente le composé majeur dans tous les cépages (allant de 0,03 à 49,64 mg/kg de peau), suivi de l'astringine (0,07 à 17,05 mg/kg de peau), du picéatannol (0,04 à 12,01 mg/kg de peau) et du resvératrol (0,07 à 6,77 mg/kg de peau). L' $\epsilon$ -viniférine est présente à des teneurs allant de 0,12 à 4,77 mg/kg de pellicule (Benbouguerra, Valls-Fonayet, et al., 2021). De plus, les baies des espèces sauvages de *Vitis* présentent une plus grande concentration d' $\epsilon$ -viniférine que les espèces cultivées (Gabaston et al., 2020).

La teneur en stilbènes peut être augmentée par des stress biotiques ou abiotiques. Par exemple, il a été rapporté que les teneurs en stilbènes des raisins rouges pouvaient être augmentées par le traitement post-récolte aux ultraviolets C. En effet, la teneur en resvératrol passe de 11,45 mg/kg à 23,55 mg/kg après traitement UV. De même le picéatannol et les viniférines ( $\epsilon$ -viniférine et  $\delta$ -viniférine) passent respectivement de 1,35 mg/kg à 6,13 mg/kg et de 0,34 mg/kg à 3,46 mg/kg (Fernández-Marín et al., 2013).

Concernant dans les vins, la teneur en stilbènes est plus élevée dans les vins rouges que dans les vins blancs. La teneur en stilbènes dans les vins rouges varie également selon le cépage (El Khawand et al., 2018). Dans les vins rouges, la teneur du resvératrol varie entre 0,2 et 5,8 mg/L (Gatto et al., 2008). Selon Benbouguerra et al. (2021a) la forme *cis*-resvératrol est plus abondante que la forme *trans* avec des teneurs allant jusqu'à 6,08 mg/L en comparaison de la

forme *trans*, qui ne dépasse pas les 3,75 mg/L (Benbougerra, Hornedo-Ortega, et al., 2021). Lee et Rennaker (2007) ont montré que les teneurs en picéide (0,4–5,9 mg/L) sont supérieures à celles du resvératrol (0-1,45 mg/L) dans les vins de Merlot, Cabernet Sauvignon, Chardonnay et Riesling comme cela a été observé dans les raisins (Lee & Rennaker, 2007).

D'autres stilbènes comme le picéatannol et certains oligomères du resvératrol tels que la *trans*- $\epsilon$ -viniférine, la vitisine A ou l'isohopéaphénol ont également été identifiés dans les vins rouges par Benbougerra et al. (2021), à des teneurs allant jusqu'à 5,22, 0,81, 3,28 et 7,47 mg/L, respectivement (Benbougerra, Hornedo-Ortega, et al., 2021). Ces teneurs en stilbènes sont rapportées dans le tableau 3.

**Tableau 6:** Quantification des stilbènes dans les vins rouges

Molécules	Vins rouges (mg/L)
<i>trans</i> - resvératrol	3,75
<i>cis</i> -resvératrol	6,08
picéatannol	5,22
<i>trans</i> - $\epsilon$ -viniférine,	0,81
vitisine A	3,28
isohopéaphénol	7,47
vitisine A	2,9
vitisine B	1,0

Outre le raisin et ses produits dérivés, les stilbènes sont présents en grande quantité dans les autres parties de la vigne, comme les feuilles, les sarments, les tiges et les racines. Dans ces parties de la plante, ils constituent la classe de polyphénols la plus importante (Sharafan et al., 2023).

En quantifiant les teneurs en stilbènes dans les différentes parties de la vigne, Gabaston et al. (2017) ont mesuré des valeurs en stilbènes d'environ 350 mg/g d'extrait sec de sarment, et de bois et 223,72 mg/g d'extrait sec de racines). L' $\epsilon$ -viniférine était le composé le plus abondant dans les sarments et le bois avec des teneurs (126,12 et 79,39 mg/g d'extrait sec respectivement, tandis que la vitisine B était le composé le plus abondant dans les racines (128,29 mg/g d'extrait sec). Le resvératrol était le second composé le plus abondant dans les sarments (61,15 mg/g d'extrait sec) (Gabaston et al., 2017).

Ainsi, les co-produits obtenus à partir de *Vitis vinifera L.* après vendanges ou vinification tels que les sarments, les tiges, et les racines constituent une source importante de stilbènes pour les industriels (Sharafan et al., 2023).

### II.2.2. Les stilbènes dans d'autres plantes que la vigne

La présence des stilbènes a été mise en évidence dans plusieurs plantes comestibles et médicinales autres que la vigne (Dubrovina & Kiselev, 2017; El Khawand et al., 2018; Rivière et al., 2012; Teka et al., 2022)

Les stilbènes ont été détectés dans plusieurs fruits (particulièrement des baies) et légumes. En effet, les stilbènes comme le resvératrol, le ptérostilbène et le picéatannol ont été identifiés dans plusieurs variétés de baies comme le bleuet, la myrtille, l'airelle rouge, la groseille rouge, et la canneberge avec une teneur en resvératrol dans ces fruits qui variait de 3 à 30 µg/g (Ehala et al., 2005; Lyons et al., 2003). Selon Rimando (2004), l'airelle rouge possède la plus grande quantité de resvératrol, presque aussi élevée que celle retrouvée dans les raisins (Rimando et al., 2004). Outre les baies, la présence de resvératrol, de picéide et de picéatannol a été observée dans d'autres aliments tels que la banane, la goyave, l'ananas, la pêche, le fruit de la passion, la poire, la fraise, la framboise, la prune, la pomme, le mûrier, les arachides, la cerise, les pistaches, le poivron, la tomate, le concombre, la carotte, l'aubergine, la laitue, et la rhubarbe (Khawand et al., 2018). Les arachides (*Arachis hypogea*) sont une source de stilbènes, en particulier ses dérivés prénylés comme les arachidines et les chiricanines (Lopes et al., 2011). D'autres stilbènes comme le gnétol ont été retrouvés dans plusieurs espèces du genre *Gnetum* comme le *Gnetum hainanense* ou *Gnetum africanum* (Xiao et al., 2008). Le miyabénol C et ses glycosides, les foeniculosides I–XI sont retrouvés dans le fenouil (De Marino et al., 2007).

Les teneurs les plus élevées en resvératrol ont été déterminées dans les arachides à 15,0 mg/kg, dans les parties aériennes du mûrier blanc (jusqu'à 7,95 mg/kg), dans les marcs de tomate (coproduit de la tomate) (825 à 1099 µg/g) (Abbasi-Parizad et al., 2022). Callemien et al. (2005) ont retrouvé le resvératrol et le picéide dans le houblon, ainsi que dans la bière à des concentrations allant de 1,3 à 77 µg/L et 1,8 à 27,3 µg/L, respectivement (Callemien et al., 2005). Le resvératrol a également été retrouvé dans le chocolat noir à des concentrations allant de 0,35 à 1,85 mg/kg (Hurst et al., 2008). Le picéatannol a été quantifié dans les graines de fruits de la passion à la hauteur de 27,17 µg/mg ou dans la bagasse (*Passiflora edulis*) à 18,59 mg/g de bagasse séchée et dégraissée (Silva et al., 2021; Viganó et al., 2016).

Outre les aliments comestibles, les stilbènes sont retrouvés en plus grande quantités dans certaines espèces qui ne sont pas consommées mais qui peuvent être utilisées dans la médecine traditionnelle en Asie tels que *Reynoutria japonica*, *Rhodomyrtus tomentosa*, *Rheum undulatum*, *Melaleuca leucadendra* et *Euphorbia lagascae* (Reinisalo et al., 2015).

La pivoine arbustive (*Paeonia × suffruticosa*) contient la plus grande teneur en resvératrol connue à ce jour avec des teneurs dans les graines et les cosses de 870 mg/kg et 260 mg/kg, respectivement, de même pour la renouée du Japon qui présente des teneurs de 421 mg/kg et 112 mg/kg dans les racines et tiges, respectivement (Hădărugă & Hădărugă, 2022).

Quelques teneurs en stilbènes rencontrées dans les aliments et plantes médicinales sont rapportées dans le tableau 4.

**Tableau 7:** Teneur et composition des stilbènes dans différentes espèces végétales d'après Dubrovina et al., 2017, modifié).

Sources des stilbènes	Contenu total en stilbènes	Composition des stilbènes	Références
Epicéa commun (écorce de racine et de souche)	58 mg/g DW	isorhapontine, Astringine	Latva-Mäenpää et al. (2013)
Pin noir (bois)	60 mg/g DW	pinosylvine	Ioannidis et al. (2017)
<i>Gnetum parvifolium</i> (tige, racines)	3,2 mg/g	picéatannol	Deng et al. (2017)
Canne à sucre	0,4 mg/g	resvératrol, picéatannol	Boue et al. (2013)
Arachides	4,3 mg/g DW	resvératrol , arachidine-1 ;2 ;3, t-SB-1 3'-isopen-tadienyl-3,5,4'-trihydroxystilbène	Sobolev, (2008)
Robinier noir	0,92 mg/g DW	resvératrol, picéatannol	Sergent et al. (2014)
Mûre (feuille et fruits)	6,1 mg/g DW	astringine, picéide, picéatannol, rhaponticine, resvératrol, rhapontigénine, ptérostilbène	Kim et al. (2008)
Myrte rose	4 mg/g DW	astringine, resvératrol piceatannol-galloyl-hexoside, , picéatannol	Lai et al. (2013)
Rénouée du Japon (racines)	11,1-19,4 mg/g DW	resvératrol, picéide, picéatannol, astringine	Beňová et al. (2008)
Rhubarbe	5,2 mg/g DW	resvératrol, picéatannol	Rokaya et al. (2012)
Tomate	0,02 mg/g DW	picéide, resvératrol	Ragab et al. (2006)

DW : matière sèche

### II.2.3. La consommation en stilbènes

Il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les apports en stilbènes par notre alimentation. Ceux-ci sont difficiles à estimer pour plusieurs raisons. En effet, ils dépendent largement de la consommation de vin rouge, principale source alimentaire en stilbènes, qui diffère dans la population. De plus, les teneurs en stilbènes varient selon les vins (Stervbo et al., 2007). Une étude réalisée dans la cohorte espagnole d'enquête prospective sur le cancer et la nutrition (EPIC)-Espagne sur 40 685 sujets avait pour objectif d'estimer l'apport alimentaire en resvératrol et picéide dans les aliments. La moyenne et la médiane estimées de l'apport de ces composés étaient respectivement de 933  $\mu\text{g}/\text{jour}$  et 100 $\mu\text{g}/\text{jour}$ . Le *trans*-picéide était le stilbène le plus abondant représentant 53,6% des stilbènes totaux, suivi du *trans*-resvératrol (20,9%), du *cis*-picéide (19,3%) et du *cis*-resvératrol (6,2%). Le vin représentait la principale source avec 98,4% des apports et les raisins et le jus de raisin 1,6% des apports, tandis que les arachides, les pistaches et les baies contribuaient à moins de 0,01% (Zamora-Ros et al., 2008). Une étude menée en Chine a évalué les apports en stilbènes provenant des aliments et des boissons à l'aide d'un questionnaire quantitatif sur le type d'aliments consommés et leur fréquence de consommation chez 1 393 sujets adultes. L'apport quotidien en stilbène est de 0,3 mg/jour (Li et al., 2013). Une étude menée en Italie dans la cohorte InCHIANTI sur 769 participants âgés de 65 ans visait à évaluer l'association entre l'exposition alimentaire habituelle au resvératrol et le développement du syndrome de fragilité, un syndrome qui résulte de déclin cumulatifs dans de multiples appareils et systèmes physiologiques chez les personnes âgées. Cette étude a estimé l'apport alimentaire en resvératrol de 0,5mg/jour, à l'aide de données de FFQ (Rabassa et al., 2015).

En résumé, les études montrent un faible apport alimentaire en stilbène en comparaison des polyphénols en général. Les apports quotidiens en stilbènes sont très différents dans le monde selon le type de régime alimentaire. Par exemple, certains végétaux sont riches en stilbènes, mais sont consommés uniquement dans des zones spécifiques. En effet, les espèces du genre *Gnetum* sont largement consommées en Asie et en Afrique contrairement à l'Europe. De même, la renouée du Japon, une plante très riche en stilbènes, est utilisée pour l'extraction du resvératrol ou du picéide afin de préparer des compléments alimentaires en Europe, alors qu'elle est consommée comme aliment ou à usage médicinal en Asie.

### II.3. Activités biologiques des stilbènes

Depuis la première mise en évidence des activités anti-cancéreuses du resvératrol par Jang en 1997 (Jang et al., 1997), les stilbènes ont suscité un intérêt croissant, de la part de la communauté scientifique et des industriels. En effet, ces composés montrent des potentielles applications dans le domaine des nutraceutiques en raison de leurs nombreuses activités biologiques en tant que molécules anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-cancérogènes, antimicrobiennes, cardioprotectrices, antidiabétiques, anti-obésité, et pour lutter contre le déclin cognitif lié à l'âge. Ces propriétés en font des composés d'intérêt dans la découverte et le développement des produits nutraceutiques et cosmétiques.

Dans ce manuscrit nous allons nous focaliser sur les activités anti-inflammatoires et antioxydantes des stilbènes, mais aussi sur leurs effets sur les maladies associées. Nous développerons ces activités au travers de modèles *in vitro*, *in vivo* et dans des études cliniques.

#### II.3.1. Activités antioxydantes des stilbènes

Les stilbènes sont essentiellement connus pour leurs activités antioxydantes à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

##### II.3.1.a. Activités antioxydantes des stilbènes *in vitro*

De très nombreuses études se sont intéressées aux activités antioxydantes des stilbènes *in vitro*, aussi bien en utilisant des molécules pures que des extraits de plantes. Les activités antioxydantes ont été mises en évidence dans des modèles acellulaires (mesures des activités anti-radicalaires à l'aide des tests ORAC, ABTS, DPPH, FRAP principalement) et cellulaires (mesures de l'inhibition de la production de radicaux libres, de l'inhibition de la peroxydation lipidique, mais aussi de l'expression d'enzymes antioxydantes). La grande majorité des stilbènes (monomères et oligomères de resvératrol ainsi que les formes glycosylées) présentent des activités anti-radicalaires et antioxydantes variables en intensité en fonction du composé, et parfois supérieures aux antioxydants de références (Y. Chen et al., 2008; Xiao et al., 2002). Les résultats observés par certaines de ces études sont résumés dans le tableau 5.

**Tableau 8:** Résumé de quelques études évaluant les activités antioxydantes des stilbènes.

Composés	Doses	Modèles	Effets	Références
resvératrol, picéatannol, picéide et $\epsilon$ -viniférine	0-200 $\mu$ M	Acellulaire ABTS	Piégeage ABTS	Nopo-Olazabal et al. 2015
resvératrol	2 $\mu$ M	Cellules endothéliales microvasculaires cardiaques	↓ ROS, MDA, ↑ activité SOD	Li et al., 2023
5-O-méthyl-( <i>trans</i> )-resvératrol 3-O-b-D-glucopyranoside (MRA) et le 5-O-méthyl-( <i>trans</i> )-resvératrol 3-O-b-D-apiofuranosyl-(1/6)-b-D-glucopyranoside (MRAG)	10-100 $\mu$ M	Cultures primaires d'hépatocytes	↑ GSH, ↑ activités des enzymes la glutathion réductase, glutathion peroxydase, SOD, piégeage du DPPH.	Yang et al., 2005

Une étude menée au laboratoire a permis d'isoler six fractions à partir de sarments de vignes, parmi lesquelles, la fraction n° 5 présente la plus forte activité antiradicalaire mesurée par le test ORAC (Biais et al., 2017). Les auteurs ont montré qu'il s'agissait d'une fraction enrichie en stilbènes dont ont été isolés treize stilbènes. Cette fraction est notamment très riche en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine, et contient également des dérivés hydroxylés (picéatannol), des dimères (ampelopsine A, pallidol,  $\delta$ -viniférine,  $\omega$ -viniférine), un trimère (myabénol C), des tétramères (hopéaphénol, isohopéaphénol, vitisine A, vitisine B) et du vitisinol C. L' $\epsilon$ -viniférine montre l'activité antiradicalaire la plus importante suivie par l'ampélopsine A, et cette activité est trois fois supérieure à celle du resvératrol. La vitisine B présente l'activité la plus faible. De plus, les auteurs ont montré que certaines des fractions pouvaient protéger les cellules neuronales PC12 d'une cytotoxicité induite par le peptide  $\beta$ -amyloïde (modèle *in vitro* de la maladie d'Alzheimer), et ont pu mettre en évidence que les composés responsables de la protection des cellules sont probablement l'ampélopsine A et le picéatannol (Biais et al., 2017). Cette activité antioxydante antiradicalaire des extraits de vigne a été confirmée dans 44 espèces de vignes européennes par Ferrier et al. (2022). Ces auteurs ont montré une corrélation entre les extraits contenant le plus de stilbènes et les activités antioxydantes les plus élevées notamment dans les tests ORAC, ABTS, FRAP, CUPRAC, DPPH et la mesure de chélation de métaux. Les variétés Savagnin blanc et Villard noir présentaient les activités antioxydantes les plus importantes dans les tests ORAC, ABTS et DPPH. Les quantités de resvératrol, de picéatannol, d' $\epsilon$ -viniférine, d'hopéaphénol, d'isohopéaphénol et de vitisine B étaient corrélées aux capacités antiradicalaires dans les tests ABTS et DPPH, ce qui confirme les capacités

antiradicalaires de ces composés. Ces auteurs suggèrent que cette capacité serait liée à un mécanisme de transfert de proton à partir de la fonction OH présente au niveau du groupement phénol de ces composés (Müller et al., 2009). Les dérivés glycosylés du resvératrol possèdent eux-aussi des capacités antiradicalaires (Mikulski and Molski, 2010 ; Yang et al., 2005). Ainsi, le 5-O-méthyl-(*trans*)-resvératrol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (MRA) et le 5-O-méthyl-(*trans*)-resvératrol-3-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1/6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (MRAG) sont capables de limiter la diminution des concentrations intracellulaires de GSH dans des hépatocytes de rat traités par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . De plus, ces deux composés augmentent les activités de la glutathion réductase, la glutathion peroxydase, et la superoxyde dismutase, qui sont des enzymes majeures pour la détoxification des ROS au niveau cellulaire. Par contre ils exercent une activité antiradicalaire faible, mesurée avec le test DPPH, ce qui indique que les activités antiradicalaires ne sont pas toujours corrélées aux activités antioxydantes intracellulaires. Ces résultats suggèrent que ces composés peuvent à la fois neutraliser des ROS présents dans les cellules mais également modifier l'expression de systèmes enzymatique pro- ou antioxydant (Yang et al., 2005).

Ces différentes études illustrent bien les propriétés antiradicalaires et antioxydantes des stilbènes, avec cependant des différences entre les composés.

Le Vineatrol<sup>®</sup>, un extrait, riche en resvératrol et en ses oligomères, diminue la formation de radicaux libres dans le test ABTS et inhibe la peroxydation lipidique dans des fibroblastes. Cet effet est similaire à celui du resvératrol. De plus, cet extrait augmente l'expression de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase, alors que le resvératrol n'a pas d'effet, suggérant ainsi un effet synergique des polyphénols présents au sein de l'extrait (Muller et al., 2009). Le fait que les extraits sont parfois plus actifs que les composés purs, illustre la notion selon laquelle les stilbènes au sein d'un mélange ont la capacité d'interagir entre eux.

### II.3.1.b. Activités antioxydantes des stilbènes *in vivo*

Les propriétés antioxydantes des stilbènes ont également été démontrées *in vivo* dans de nombreuses études réalisées chez le rat et le hamster notamment. La plupart de ces études ont utilisé soit du resvératrol soit des extraits comme le Vineatrol<sup>®</sup> cité précédemment. Les auteurs ont mesuré divers marqueurs de stress oxydant comme la peroxydation lipidique, la production de monoxyde d'azote (NO) ou d'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ), les concentrations du glutathion (GSH) ou encore l'expression et l'activité d'enzymes pro-oxydante (xanthine oxydase) ou



antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase). Tout comme pour les études *in vitro*, la totalité des études *in vivo* mettent en évidence des effets antioxydants des stilbènes.

Dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat, les auteurs montrent qu'une supplémentation en resvératrol (100 mg/kg) juste après le traumatisme diminue de manière significative la peroxydation lipidique, la production de NO, l'expression de la xanthine oxydase et augmente les concentrations en GSH par rapport à des animaux non traités. Ces effets antioxydants sont associés à une diminution des lésions induites par le traumatisme, et les auteurs concluent que le resvératrol favoriserait la récupération après un traumatisme en limitant la génération d'un stress oxydant (Ates et al., 2006). Dans un autre modèle mimant l'endométriose chez la rate, les auteurs ont également montré que la supplémentation en resvératrol induisait une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase et une diminution des taux de malondialdéhyde (MDA) à la fois dans le sérum mais aussi dans les tissus lésés de l'animal (Yavuz et al., 2014). Chez le hamster nourri par un régime riche en graisses pendant plusieurs semaines, une supplémentation en Vineatrol® limite la production des ROS ( $O_2^{\circ-}$ ) mais aussi de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6). Cette supplémentation réduit également la résistance à l'insuline, la lipidémie et les concentrations sanguines de leptine ce qui pourrait limiter les facteurs de risque cardio-métaboliques et ainsi prévenir les complications liées à l'obésité (Romain et al., 2012). Ainsi, dans différents modèles mimant des pathologies dans lesquelles un stress oxydatif joue un rôle important, le resvératrol est capable de limiter ce stress et d'exercer des effets bénéfiques. Une supplémentation par le resvératrol ou par des extraits contenant des stilbènes pourrait alors apporter un bénéfice en tant que traitement adjuvant dans la prise en charge de ces pathologies.

### II.3.1.c. Etudes cliniques sur les activités antioxydantes des stilbènes

En parallèle de ces effets observés *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, un certain nombre d'essais cliniques ont été menés et ont montré un effet antioxydant des stilbènes chez l'Homme.

Il est connu que le stress oxydatif joue un rôle central dans la physiopathologie de plusieurs maladies métaboliques comme par exemple, le diabète de type 2 (DT2). Une étude clinique randomisée a évalué l'effet d'une supplémentation en resvératrol, versus un groupe traité par placebo, sur les marqueurs du stress oxydatif chez 97 personnes âgées atteintes de DT2. Ces patients ont été répartis en plusieurs groupes recevant soit du resvératrol à la dose de 500 mg ou 1000 mg/jour, soit un placebo pendant 6 mois. La supplémentation en resvératrol à 1000 mg/jour a montré un bénéfice en diminuant les marqueurs de stress oxydant (diminution du

taux de MDA, des taux d'isoprostane, augmentation des activités de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase) par rapport au groupe de patients traités par la dose de 500 mg/jour ou par le placebo (García-Martínez et al., 2023). De la même manière, un essai clinique incluant 48 patients atteints de DT2 a montré qu'une dose intermédiaire de resvératrol (800 mg) administrée quotidiennement pendant 2 mois réduit significativement la teneur en protéines plasmatiques carbonylées et le niveau d'anion superoxyde dans les leucocytes mononucléés périphériques. Les auteurs ont également mis en évidence une augmentation de la teneur totale du glutathion et une augmentation de l'expression du facteur nucléaire Nrf2, impliqué dans la voie de signalisation régulant les enzymes impliquées dans la prise en charge d'un stress oxydant au niveau cellulaire (Seyyedebrahimi et al., 2018). Ces deux études cliniques apportent donc la preuve qu'une supplémentation en resvératrol peut avoir un rôle antioxydant chez l'Homme et pourrait réduire le développement de la maladie ou de ses complications. Il convient néanmoins de garder à l'esprit que ces études cliniques sont peu nombreuses, et que par ailleurs les traitements ont été effectués sur une courte durée (administration quotidienne pendant 2 ou 6 mois). Cet effet bénéfique sur le stress oxydant d'une supplémentation en resvératrol a également été mis en évidence dans une autre pathologie chronique, la colite ulcéreuse. Au cours de cet essai clinique incluant 56 patients atteints d'ulcère léger à modéré, les auteurs ont observé que l'administration quotidienne de resvératrol à la dose de 500 mg/jour pendant 6 semaines limite le stress oxydatif (augmentation de l'activité de la SOD et diminution des taux de la MDA) par rapport au groupe de patients traités par un placebo. De plus, la supplémentation en resvératrol améliore de manière significative la qualité de vie des patients par rapport au groupe placebo (Samsamikor et al., 2016) Par contre cet effet bénéfique d'une supplémentation en resvératrol n'a pas été retrouvé dans la stéatose hépatique non alcoolique. En effet, chez ces patients atteints, le resvératrol ne modifiait ni les taux de MDA, ni l'activité de la SOD érythrocytaire (Asghari et al., 2018).

Le DT2 tout comme la colite ulcéreuse étant des pathologies chroniques, si le resvératrol était destiné à devenir un traitement adjuvant aux thérapies déjà connues, une supplémentation sur le long court semble donc indispensable, et les études manquent cruellement pour confirmer les effets bénéfiques du resvératrol d'un côté et les niveaux de doses à utiliser.

### II.3.2. Effets anti-inflammatoires des stilbènes

Il existe une abondante littérature selon laquelle différents stilbènes peuvent réduire l'inflammation et les maladies associées dans les modèles *in vitro*, *in vivo* et dans les études cliniques

#### II.3.2.a. Effets anti-inflammatoires des stilbènes *in vitro*

Dans de nombreuses pathologies, le stress inflammatoire est souvent associé au stress oxydant, et un grand nombre d'études ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires des stilbènes. Ces propriétés ont été étudiées principalement dans des modèles de cellules qui interviennent dans les processus inflammatoires (macrophages, cellules de la microglie, chondrocytes en culture primaire). Dans ces modèles, l'inflammation est souvent stimulée par un lipopolysaccharide (LPS). L'effet anti-inflammatoire a été estimé la plupart du temps par la mesure de la production de médiateurs de l'inflammation, tels que NO, PGE2, IL-1, IL-8 et TNF- $\alpha$ . La quasi-totalité des études montrent que les stilbènes présentent une activité anti-inflammatoire avec toutefois des différences de niveaux d'activités en fonction du composé considéré. Les résultats observés sont résumés dans le tableau 6 et quelques exemples sont donnés dans les paragraphes suivants.

**Tableau 9:** Résumé de quelques études évaluant les activités anti-inflammatoires des stilbènes.

Composé	Dose	Modèle	Effet	Reference
Miyabenol A	0,1-10 $\mu$ M	RAW264.7	↓ NO, iNOS, ↓ MAPK , ↓ translocation nucléaire NF- $\kappa$ B	Ku et al., 2008
Extrait de <i>Vitis thunbergii</i> var. taiwaniana riche en resvératrol, $\epsilon$ -viniférine et espoiraphénol	500 mg/kg	Lapin	↓ PGE2 sérique	(Tsai et al., 2014)
$\epsilon$ -Viniférine	1-30 $\mu$ M	RAW 264.7	↓ PGE2, NO ↓ expression de iNOS et COX-2, ↓ NF- $\kappa$ B	Ha et al., 2018
Resvératrol $\epsilon$ -Viniférine	1 et 10 $\mu$ M	Co-cultures primaires murines de neurones et d'astrocytes	↓ TNF- $\alpha$ et l'IL-6	Vion et al., 2018

Deux études ont effectué un criblage des propriétés inflammatoires de plus d'une vingtaine de stilbènes, allant des dérivés monomériques jusqu'aux dérivés tétramériques du resvératrol, dans des macrophages murins et dans des cellules microgliales murines. La totalité des composés

étudiés montraient une activité anti-inflammatoire en diminuant la production de NO, en diminuant l'expression et l'activité de l'iNOS, et en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1). Ces auteurs ont observé que certains monomères (picéatannol) et oligomères du resvératrol comme l' $\epsilon$ -viniférine (un dimère), l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol, la vitisine A et la vitisine B (des tétramères) possèdent les activités anti-inflammatoires les plus importantes parmi les composés testés. Cependant, les auteurs soulignent que certains de ces composés, et notamment les tétramères, présentent une cytotoxicité marquée ce qui pourrait limiter leur utilisation (Aja-Perez et al., 2021; Nassra et al., 2013). Néanmoins l'activité anti-inflammatoire n'est pas toujours reliée au degré d'oligomérisation du composé car certaines études montrent qu'un dimère comme le vitisinol A présente une activité anti-inflammatoire beaucoup plus marquée que des tétramères comme la vitisine A ou la vitisine B (Chang et al., 2017). Enfin les auteurs mentionnent également la possibilité d'effets synergiques des composés (K.-T. Wang et al., 2011). De plus, dans les études mentionnées ci-dessus ainsi que celle de Dilshara et al. (2014), les auteurs ont observé que les mécanismes mis en jeu impliquaient le plus souvent une inhibition de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B régulant à la baisse l'expression de la iNOS et de la COX-2 (Dilshara et al., 2014; Ha et al., 2018; Ku et al., 2008).

L'inflammation et le stress antioxydant étant deux processus souvent liés, certaines d'études se sont intéressées à la fois à ces deux mécanismes. Dans l'une d'entre elles, un extrait de *Vitis vinifera*, riche en resvératrol, picéatannol,  $\epsilon$ -viniférine, ampélopsine A, miyabénol C, vitisine A (r-2-viniférine) et vitisine B (r-viniférine) exerce à la fois des activités anti-radicalaires, antioxydantes et anti-inflammatoires et peuvent protéger les cellules de dommages à l'ADN induits par l' $H_2O_2$  (Esatbeyoglu et al., 2016). Dans cette étude utilisant l'extrait et non les molécules pures, les auteurs ne peuvent conclure quant à la l'activité des molécules individuelles. Une autre étude a observé que la quasi-totalité des stilbènes isolés de *Vitis amurensis* avaient la capacité d'inhiber l'activité de la lipoxigénase, une enzyme impliquée dans la production de médiateurs de l'inflammation comme les leucotriènes. Parmi ces composés, la r-2-viniférine (un tétramère) présentait l'activité inhibitrice la plus forte alors que le picéatannol et le picéide (deux monomères) avaient quant à eux les activités inhibitrices les plus faibles. A l'inverse, le picéatannol présente les activités antioxydantes les plus efficace (test DPPH et mesure de la peroxydation lipidique). Cette observation confirme qu'il n'existe pas toujours de corrélation entre les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de ces composés (Ha et al., 2009).

*In vitro*, les monomères et oligomères du resvératrol possèdent une activité anti-inflammatoire en inhibant la production de médiateurs de l'inflammation. Ces propriétés ne semblent néanmoins pas liées au degré d'oligomérisation des composés, les oligomères n'étant pas forcément plus actifs que les monomères. Il ne semble pas non plus exister de relation claire entre la structure des composés et leurs activités, ainsi que de corrélation entre leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Parmi les composés testés, certains possèdent une cytotoxicité importante ce qui pourrait constituer un frein pour leur utilisation.

### II.3.2.b. Effets anti-inflammatoires des stilbènes *in vivo*

En parallèle des effets anti-inflammatoires *in vitro* des stilbènes, un grand nombre d'études ont été menées pour déterminer si ces effets se retrouvaient *in vivo*. Ces études ont été menées sur des modèles divers d'inflammation, par exemple chez le singe (résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse), le lapin (arthrite inflammatoire), la souris (œdème de l'oreille, hépatite, cancer mammaire) et le rat (colite). Ces études rapportent que la supplémentation en stilbènes, qu'ils soient de nature monomérique ou oligomérique limite le stress inflammatoire ce qui a un effet sur la pathologie associée. Ces études sont résumées dans le paragraphe suivant et dans le tableau 6.

Les effets d'une supplémentation en resvératrol (80 et 480 mg/jour) pendant deux ans sur le profil pro-inflammatoire et la résistance à l'insuline, chez le singe rhésus ont été étudiés. Les résultats obtenus dans le tissu adipeux blanc montrent une diminution de l'expression des gènes codant pour l'IL-6. Cet effet passerait par une inhibition de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Jimenez-Gomez et al., 2013). Dans un modèle d'inflammation cutanée chez la souris, plusieurs auteurs ont montré que l'administration topique de vitisinol A ou de resvératrol pouvait réduire un œdème cutané induit par le tétradecanolphorbol acétate (TPA) et limiter l'infiltration de neutrophiles dans le tissu lésé. De manière surprenante, les auteurs ont également observé que ces stilbènes exerçaient une activité anti-inflammatoire identique (resvératrol), voir meilleure (vitisinol A) que celle de l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé dans ce modèle comme référence (Bralley et al., 2008; Chang et al., 2017). Il a également été montré que la supplémentation en  $\epsilon$ -viniférine est capable de diminuer de manière significative les taux de PGE2 ainsi que les taux de TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-6, et IL-1 dans des modèles d'arthrite chez le lapin ou d'hépatite induite par un traitement à l'endotoxine chez la souris, respectivement (Kurundkar et al., 2019; Tsai et al., 2014). Enfin, dans des cultures d'organes de glandes mammaires de souris, le resvératrol, le *trans*-picéatannol et 5 monomères glycosylés resvératrol

(*trans*-astringine, *trans*-picéide, *cis*-picéide, *trans*-resvératrolside, *cis*-resvératrolside) sont capables d'inhiber l'expression des cyclo-oxygénases et de limiter la formation de lésions néoplasiques induite par le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène. Il s'agit cependant d'une étude réalisée sur des organoïdes qui nécessite une confirmation *in vivo* chez l'animal. Néanmoins, ces résultats suggèrent que les dérivés glycosylés du resvératrol ainsi que le *trans*-picéatannol pourraient représenter de bons candidats comme agents de chimioprévention (Waffo-Téguo et al., 2001). Il est possible que ces effets impliquent une inhibition de l'expression des enzymes iNOS et COX-2 via l'inhibition de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B associé à une augmentation de l'expression de l'HO-1 après stimulation de la voie Nrf2 comme cela a été montré pour le picéatannol dans un modèle de colite induite chez le rat par l'acide trinitrobenzène sulfonique (Yum et al., 2015).

En parallèle des études mentionnées ci-dessus, quelques revues sur le sujet ont déjà été rédigées et nous invitons le lecteur à les consulter s'il souhaite obtenir plus de renseignements (Al-Khayri et al., 2023; Beaumont et al., 2022; Dvorakova & Landa, 2017).

### II.3.2.c. Études cliniques sur les activités anti-inflammatoires des stilbènes

La majorité des études cliniques actuellement réalisées sur les stilbènes porte principalement sur le resvératrol. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, nous avons pu recenser 193 essais enregistrés sur le site <https://clinicaltrials.gov/> traitant des activités biologiques du resvératrol. Parmi ces essais, 22 sont relatifs à ses propriétés anti-inflammatoires. Dans les paragraphes suivants sont résumés, à titre d'exemple, quelques études dans lesquelles des marqueurs inflammatoires ont été mesurés. Les essais cliniques ont évalué les effets préventifs et curatifs du resvératrol contre un certain nombre de maladies et de troubles, notamment le diabète, l'obésité, certains cancers, les maladies neurologiques et cardiovasculaires, ainsi que certaines infections virales et bactériennes. Une revue récente a couvert certains des derniers essais cliniques utilisant ce stilbène (Konings et al., 2014; Singh et al., 2019). L'autorité européenne de sécurité alimentaire recommande une dose journalière maximale de resvératrol ne dépassant pas 150 mg/kg. La plupart des études cliniques ne relèvent pas d'effets indésirables pour des doses comprises entre 10 et 1000 mg par jour, confirmant ainsi que ce composé semble sûr dans les conditions utilisées.

Une supplémentation en resvératrol (resVida™, 150 mg/jour pendant 1 mois) chez des hommes obèses a montré qu'il était capable de réduire des marqueurs de l'inflammation comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  ainsi que le nombre de leucocytes circulants. En parallèle il diminuait également les teneurs en lipides intrahépatiques, le taux de triglycérides, les taux de l'alanine

aminotransférase (ALAT) et la tension artérielle chez les patients traités (Timmers et al., 2011). Cet effet de diminution des marqueurs de l'inflammation a été confirmé chez des patients atteints de diabète de type 2 (Tomé-Carneiro et al., 2013; Mahjabeen et al., 2022), des patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (S. Chen et al., 2015), des patients présentant des facteurs de risques pour des maladies cardiovasculaire (Tomé-Carneiro et al., 2012), des patients atteints d'arthrite (Shi et al., 2017) et de colite ulcéreuse (Samsamikor et al., 2016) ou encore chez les patients présentant un syndrome métabolique (Tabrizi et al., 2018)

Bien que les stilbènes aient montré des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques est limitée en raison de leur faible biodisponibilité due à leurs métabolismes hépatique et intestinal intenses.

#### **II.4. Biodisponibilité de stilbènes**

La biodisponibilité d'une substance désigne la proportion de cette substance qui atteint la circulation systémique de façon inchangée après sa digestion, son absorption et son métabolisme. L'étude de la biodisponibilité des polyphénols est importante pour évaluer les effets biologiques de ces composés démontrés *in vitro*. En effet, pour qu'un composé soit actif sur un organe cible, il doit pouvoir atteindre celui-ci sous sa forme native, c'est à dire non transformée (non métabolisée).

La première étude réalisée sur la biodisponibilité d'un stilbène a été publiée par Bertelli sur le resvératrol en 1996. Ces auteurs ont mis en évidence la présence de ce composé dans différents fluides et organes chez le rat après administration orale (Bertelli et al., 1996). Depuis, de nombreux travaux ont évalué l'absorption, le métabolisme et la distribution de ce composé à l'aide de divers modèles d'étude. Plus récemment, la biodisponibilité de quelques monomères et oligomères du resvératrol a été étudiée. Dans ce travail, nous nous focaliserons sur la l'absorption et le métabolisme du resvératrol et de l' $\epsilon$ -viniférine.

##### **II.4.1. Absorption et métabolisme du resvératrol**

Il a été rapporté que le resvératrol est très bien absorbé avec environ 75 % du resvératrol qui est absorbé au niveau intestinal, tandis que les 25 % restants sont directement excrétés (Walle et al., 2004). Cependant, malgré cette forte absorption intestinale, le resvératrol présente une faible biodisponibilité (1 à 2%). En effet, le resvératrol subit un métabolisme rapide et important,

d'abord dans l'intestin puis dans le foie, mais également au niveau du microbiote intestinal (Z. Liu & Hu, 2009).

### Métabolisme

Le resvératrol peut subir deux types de métabolisme : un métabolisme de phase I et un de phase II. Les réactions de phase I sont principalement réalisées par les cytochromes P450, qui rendent la molécule plus polaire à travers des processus d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (Foster et al., 2004). Une étude *in vitro* de Piver et al. (2004) utilisant des microsomes du foies humains a montré la formation de deux métabolites oxydés du resvératrol résultant des réactions de phase I à savoir le picéatannol et le 3,4,5,4'-tétrahydroxystilbène (Piver et al., 2004).

Le métabolisme de phase II est réalisé principalement par les uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférase (UGT) et les sulfotransférases (SULT). Les niveaux d'expression de ces enzymes de phase II ont une influence majeure sur le profil des conjugués de resvératrol générés dans différents organes du corps (Böhmdorfer et al., 2017).

Les enzymes UGT, situées dans le réticulum endoplasmique des cellules, sont une grande famille d'enzymes apparentées qui catalysent la réaction de glucuronidation en transférant un acide glucuronique, de l'acide UDP-glucuronique aux groupes hydroxyles du resvératrol, générant ainsi des O-glucuronides de resvératrol. La glucuronidation du resvératrol est une réaction régiosélective qui est principalement catalysée par les UGT1A1 et UGT1A9, ce qui conduit au resvératrol-3-O-glucuronide et/ou au resvératrol-4'-O-glucuronide (Aumont et al., 2001; Radomska-Pandya et al., 1999; Springer & Moco, 2019; Wang et al., 2004). Il est également admis que la glucuronidation, contrairement à la sulfatation, est une voie métabolique saturable (Andres-Lacueva et al., 2012).

La superfamille des sulfotransférases (SULT), catalysent les réactions de sulfatation, en transférant un groupe sulfate de la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPs) vers un groupe hydroxyle du resvératrol. Parmi les sulfotransférases, la SULT1A1 est principalement responsable de la sulfatation du resvératrol en resvératrol-3-O-sulfate, tandis que le resvératrol-4'-O-sulfate est principalement produit par SULT1A2, et le resvératrol-3,4'-O-disulfate est principalement catalysé par SULT1A2 et SULT1A3 (Springer & Moco, 2019).

Il existe une variation inter-espèces du métabolisme de phase II, à cet égard, la glucuronidation est la principale réaction de conjugaison chez les rongeurs et les porcs, tandis que la sulfatation est plus abondante chez l'homme (Azorin-Ortuno et al., 2011; Boocock et al., 2008; Marier et al., 2002). Hormis la différence entre espèces, les proportions de métabolites glucuronidés et



sulfatés dépendent de la dose de resvératrol administrée, du tissu, et de l'expression enzymatique (Azorín-Ortuño et al., 2011).

Le resvératrol peut également être métabolisé par le microbiote intestinal par des réactions d'oxydation, d'hydrogénation, et de déshydroxylation (Kardum et al., 2018). Il a été rapporté que la flore intestinale métabolise le resvératrol en dihydroresvératrol par hydrogénation de la double liaison entre les deux anneaux phénoliques, mais aussi en d'autres métabolites tels que le 3,4'-dihydroxystilbène et la lunularine (Chaplin & Carp, 2018).

A ce jour, plus de 15 métabolites du resvératrol sont identifiés au sein de l'organisme après administration orale (Springer & Moco, 2019). Quelques métabolites du resvératrol sont illustrés dans la figure 8.

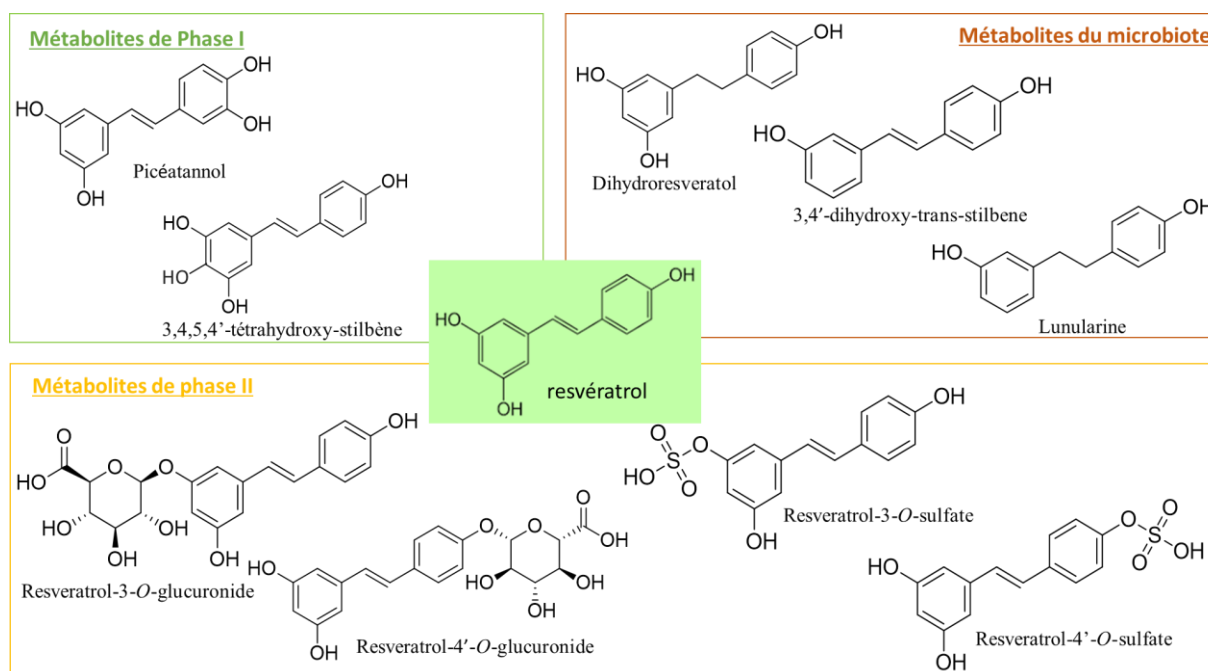


Figure 8: Principaux métabolites issus du métabolisme de phase I, II et du microbiote intestinal.

### Transport

Au niveau intestinal, le resvératrol traverse la membrane apicale de l'entérocyte par diffusion passive. Après être entré dans l'entérocyte, il peut soit ressortir du côté apical, soit ressortir du côté basolatéral, soit être métabolisé. L'efflux du resvératrol du côté apical est pris en charge par la protéine associée à la résistance aux médicaments de type 2 (MRP2) (Kaldas et al., 2010;



*Pharmacocinétique du resvératrol chez les animaux*

Le groupe de Bertelli et al., a été l'un des premiers à décrire l'absorption et la distribution du resvératrol par le tractus gastro-intestinal en 1996 (Bertelli et al., 1996). Dans ces études, les rats ont reçu une dose de 4 mL de vin rouge contenant de resvératrol (6,5 mg/L). Les résultats ont montré que le resvératrol était rapidement absorbé et détectable en 30 min, avec les taux plasmatiques et hépatiques de resvératrol atteignant leur maximum 1 heure après administration (environ 0,03 µg/mL). Dans les reins, la concentration maximale de resvératrol a été atteinte 2 heures après l'administration, mais a diminué beaucoup plus lentement (Bertelli et al., 1996).

Une étude de Vitrac et al. (2003) visait à étudier l'absorption, le métabolisme et la distribution tissulaire du resvératrol après administration orale de resvératrol radiomarqué chez la souris. Les auteurs observèrent une absorption rapide de resvératrol, un métabolisme en dérivés glucuronidés et sulfatés ainsi qu'une distribution différentielle dans divers organes tels que le cerveau, les poumons, le cœur, le foie, les reins, la rate, le duodénum, le côlon et les testicules. La concentration la plus élevée se trouvait dans le duodénum, la plus faible dans les reins, suivis des poumons et du foie. L'excrétion rénale semblait être l'une des principales voies d'élimination du resvératrol comme le souligne sa forte présence dans les urines. Il s'agissait de la première étude mettant entièrement en évidence le processus absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) du resvératrol dans l'organisme entier d'un mammifère (Vitrac et al., 2003). Une étude menée par Bohmdorfer et al. (2017) a évalué le métabolisme et la distribution du resvératrol dans le plasma, l'urine, fèces et 14 tissus de souris après administration orale de resvératrol (10 mg/kg). Le resvératrol était détecté principalement sous ses trois principales formes conjuguées à savoir resvératrol-3-O-glucuronide, resvératrol-3-O-sulfate et resvératrol-3-O-4'-O-disulfate dans les différents organes. Sa concentration globale était supérieure à celle de ses métabolites certains organes comme l'estomac, le cæcum, le côlon, la rate, le cœur, les poumons, le thymus et les muscles. Les auteurs ont également observé une recirculation entéro-hépatique du resvératrol libre dû à un clivage du resvératrol 3-O-glucuronide par la  $\beta$ -glucuronidase après excrétion biliaire. En analysant l'expression enzymatique, ils ont noté que les UGT1A1 et UGT1A6 étaient les principales enzymes de glucuronidation du resvératrol en resvératrol-3-O-glucuronide dans le foie, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Alors que SULT1A1 était la principale enzyme de sulfatation du resvératrol en resvératrol-3-O-sulfate et en resvératrol-3-O-4'-O-disulfate dans le foie et le côlon (Bohmdorfer et al., 2017).

Pharmacocinétique du resvératrol chez l'Homme

Il existe de nombreuses études sur la pharmacocinétique du resvératrol chez l'homme montrant une très faible biodisponibilité de celui-ci. Deux des premières études menées chez l'Homme sur la biodisponibilité du resvératrol utilisant une administration orale de 25 mg, ont montré que la concentration plasmatique du resvératrol se situait uniquement dans la plage nanomolaire par rapport à la plage micromolaire de ses métabolites (Goldberg et al., 2003; Walle et al., 2004).

L'étude de Goldberg et al. (2003) a démontré une absorption rapide, ainsi qu'une faible biodisponibilité du resvératrol libre (1,7 % à 1,9 %), dû à un fort métabolisme. Ce métabolisme intense donnait principalement des métabolites glucuronidés et sulfatés atteignant une C<sub>max</sub> environ 30 minutes après la consommation qui étaient ensuite excrétés par voie urinaire (Goldberg et al., 2003). L'étude plus précise de Walle. (2004) utilisant un traceur marqué radioactif (<sup>14</sup>C RES) par voie orale (25 mg) montrait une forte absorption orale du resvératrol avec des taux d'absorption d'au moins 70 %, suivi d'une biotransformation rapide et étendue en cinq métabolites principaux, deux monoglucuronides, le monoglucuronide du dihydroresvératrol, le monosulfate de resvératrol et le monosulfate de dihydroresvératrol. Cette biotransformation rapide et intense entraînait une faible biodisponibilité comme le souligne la faible concentration plasmatique du resvératrol libre < 5ng/mL (≈ 40 nM) et les taux plasmatiques maximaux de resvératrol et de ses métabolites de 491 ±90 ng/ml (≈ 2 μM) atteints environ 1 h après administration. La formation rapide du sulfate par l'intestin/le foie indiquait que la sulfatation pourrait être le principal facteur limitant de la biodisponibilité du resvératrol. Les auteurs ont observé une recirculation entéro-hépatique des métabolites conjugués environ 6 h après la consommation. Le resvératrol et ses métabolites étaient par la suite éliminés par excrétion urinaire et biliaire (Walle, 2004).

Certaines études ont permis d'évaluer l'influence de différentes doses orales sur la pharmacocinétique du resvératrol en administrant des doses uniques de 0,5, 1, 2,5 ou 5 g, chez 10 des volontaires sains. Boocock et al. (2007) ont observé une absorption rapide du resvératrol, atteignant une concentration plasmatique maximale dans les 0,83 h à 1,5 h après l'administration. Les concentrations plasmatiques maximales de resvératrol étaient de 73 à 539 ng/mL (0,3 à 2,4 μM, respectivement) après l'ingestion de 0,5 et 5 g de resvératrol, respectivement. Les auteurs mettent en évidence un léger rebond de la C<sub>max</sub> du resvératrol après 5 à 6 h caractéristique d'un cycle entéro-hépatique de la molécule. Les auteurs ont montré la production de trois principaux métabolites dont le resvératrol-3-O-sulfate semblait être le métabolite le plus abondant (3,7–14 μM), suivi des deux formes monoglucuronidées du

resvératrol. Les concentrations totales des métabolites pouvaient dépasser jusqu'à 20 fois celle du resvératrol (Boocock et al., 2007). Récemment, une étude a été réalisée par Wang et Sang (2018) chez des volontaires sains ayant ingéré de faibles doses (5 ou 50 mg) et fortes doses (> 250 mg) de resvératrol par voie orale. Les auteurs ont observé que l'ingestion de faibles doses de resvératrol entraînait principalement la production des métabolites glucuronidés contrairement aux doses élevées qui entraînaient la production du resvératrol-3-O-sulfate (Wang and Sang, 2018).

#### II.4.2. Absorption et métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine

L' $\epsilon$ -viniférine présente une très faible biodisponibilité en raison d'une faible absorption et d'un métabolisme intestinal et hépatique de phase II très prononcés. Il a été rapporté que l' $\epsilon$ -viniférine avait une biodisponibilité orale extrêmement faible de 0,771% après une administration orale de 40 mg/kg chez la souris. La C<sub>max</sub> moyenne de la viniférine était de  $42,0 \pm 11,9$  ng/mL, survenant à un T<sub>max</sub> de 15 min. La faible biodisponibilité orale pourrait être due à une mauvaise absorption et à un métabolisme intestinal important (J. Kim et al., 2017). En effet, contrairement au resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine semble être très peu absorbée dans les l'épithélium intestinal humain (Willenberg, 2015). Cependant, l' $\epsilon$ -viniférine subit un intense métabolisme hépatique comme démontré précédemment au laboratoire (Beaumont et al., 2021; Courtois et al., 2017, 2018). En effet, Courtois et al. (2017) ont démontré *in vitro* que l' $\epsilon$ -viniférine subissait un métabolisme intense dans lequel plus de 75% de l' $\epsilon$ -viniférine a été transformée en 4 métabolites glucuronidés et 4 métabolites sulfatés chez le rat et chez l'homme. Les auteurs montrèrent également l'existence d'une différence inter espèces dans le métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine, puisque la glucuronidation semble prédominer chez les rats et que la glucuronidation et la sulfatation étaient impliquées chez l'homme (Courtois et al., 2017). *In vivo*, Courtois montre que l' $\epsilon$ -viniférine, administrée en intrapéritonéal, a subi un métabolisme hépatique intensif et rapide (T<sub>max</sub> 15 min) donnant principalement des formes glucuronidées et dans une moindre mesure des formes sulfatés. Les concentrations les plus élevées de glucuronides étaient trouvées dans le foie suivies par le plasma, des reins et également dans les tissus adipeux (en plus faibles concentrations). Cependant, les auteurs remarquèrent une bioaccumulation de la forme native dans le tissu adipeux blanc, suggérant que ces tissus pourraient servir de réservoir pour la forme native, permettant ainsi une libération lente et une présence à long terme dans l'organisme. Une étude récente de Beaumont et al. (2021) a été menée afin d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de l' $\epsilon$ -viniférine après

administration orale de 20 mg/kg chez le rat. Les auteurs observèrent une forte glucuronidation hépatique de l' $\epsilon$ -viniférine et une accumulation importante dans le tissu adipeux blanc. En effet, les glucuronides atteignaient une Cmax 108 fois supérieure à la forme native (respectivement  $1667,4 \pm 1103,3$  pmol/mL de glucuronides et  $15,3 \pm 10,5$  pmol/mL d' $\epsilon$ -viniférine) dans le plasma. Cependant, la quantité relative de la forme aglycone était élevée dans le tissu adipeux blanc (environ 50 % des formes aglycones et 50 % des formes glucuronides) (Beaumont et al., 2021)

## **OBJECTIF DE LA THESE**

L'inflammation et le stress oxydant sont deux processus qui participent en partie à l'étiologie de plusieurs maladies chroniques comme le diabète de type 2, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, ou encore les maladies neurodégénératives. Ces maladies chroniques sont responsables de 85 % de la mortalité en Europe. De ce fait, la prise en charge de l'inflammation et du stress oxydant représente une stratégie intéressante dans la lutte contre ces maladies.

En raison de leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes reconnues, les polyphénols sont une classe de molécules naturelles de notre alimentation qui présenteraient un réel intérêt dans la prévention de ces maladies chroniques. Cependant, sur le plan fondamental, les études sur les effets anti-inflammatoires et antioxydants des polyphénols sont souvent réalisées sur les molécules individuelles. Or, dans notre alimentation ou dans le domaine de la nutraceutique, ces molécules se retrouvent en mélange complexe. Celles-ci peuvent alors interagir et modifier (augmenter ou réduire) ou non l'effet biologique des molécules individuelles. Un autre phénomène est à prendre en compte pour évaluer les activités biologiques de polyphénols, c'est le métabolisme que peuvent subir ces composés après ingestion et qui modifient leurs biodisponibilités et donc leurs activités biologiques.

L'étude des interactions entre les molécules ainsi que celle de leur métabolisme, sont donc deux points essentiels pour comprendre leurs effets biologiques.

Les principaux objectifs de ce travail de thèse furent alors les suivants :

- Evaluer l'impact des interactions entre trois stilbènes, le resvératrol et deux de ses oligomères ( $\epsilon$ -viniférine et vitisine B), sur leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.
- Etudier le métabolisme cellulaire de ces trois composés et ses conséquences sur leur propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.



Dans une première partie, nous avons évalué les propriétés antiradicalaires du resvératrol, de l'ε-viniférine et la vitisine B puis comparé ces propriétés lorsque ces composés sont présents au sein d'un mélange. Ces propriétés ont été évaluées dans différents modèles acellulaires.

Dans une seconde partie, nous avons évalué sur une lignée cellulaire de macrophages murins les effets antioxydants et anti-inflammatoires du resvératrol, de l'ε-viniférine et la vitisine B puis comparé ces effets lorsque ces composés sont présents au sein d'un mélange, ainsi que les effets biologiques des métabolites du resvératrol. Ces effets ont été mesurés dans un modèle de macrophages murins stimulés par le LPS.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons étudié le métabolisme du resvératrol.

### Stratégie expérimentale de la thèse

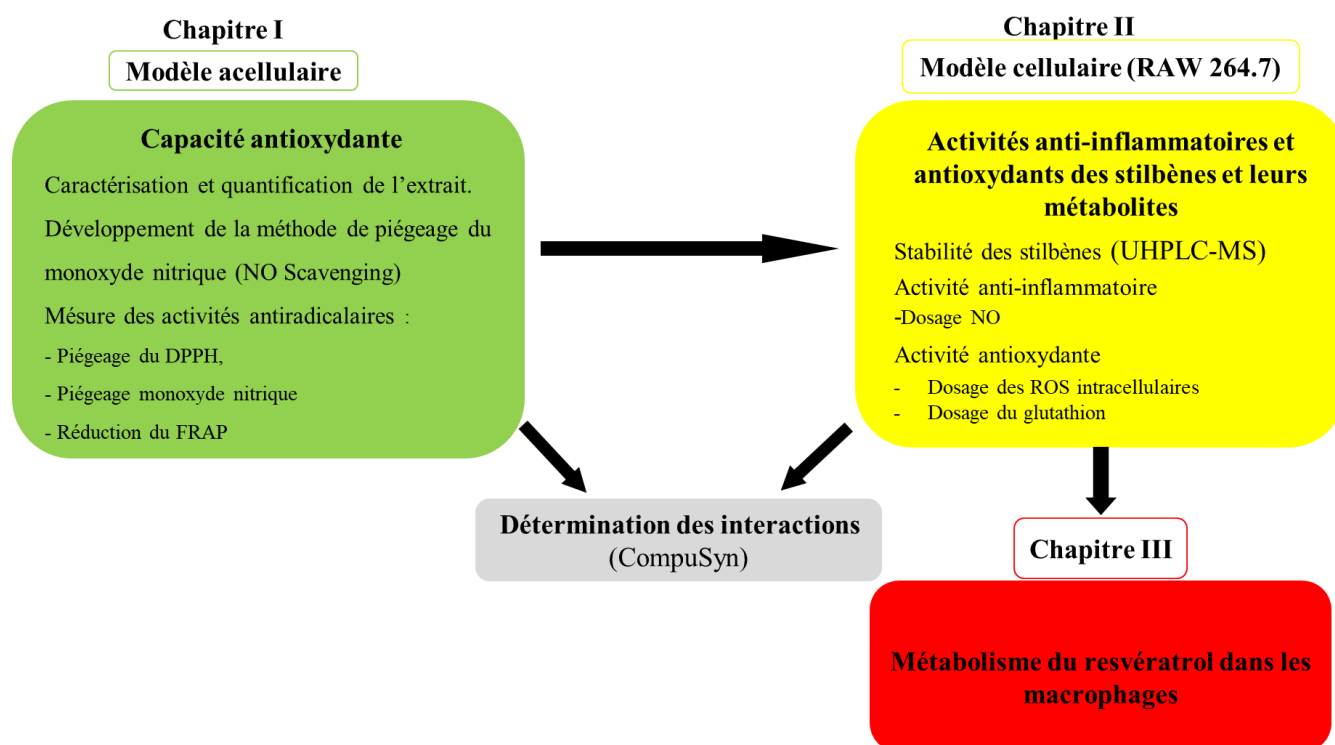


Figure 10: Démarche expérimentale de la thèse

## **MATERIELS ET METHODES**

## I. Matériels

### I.1. Modèle cellulaire

La lignée cellulaire RAW 264.7 est une lignée de macrophages murins qui a été établie à partir d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson chez une souris mâle. Il s'agit de cellules semi-adhérentes, utilisées entre les passages 5 et 20. Ces cellules sont fréquemment utilisées les études des activités anti-inflammatoires des composés naturels (An-Na Li et al., 2014). Elles ont été obtenues auprès de la société Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

### I.2. Produits chimiques et réactifs

La majorité des produits utilisés dans ce travail a été obtenue auprès de la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ces produits comprenaient : le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH); le nitroprussiate de sodium (SNP); l'acétate de sodium; La 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), -'acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (trolox), le chlorure de fer hexahydraté ; le réactif de Griess, le Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), le sérum de veau fœtal (FBS), le Roswell Park Memorial Insitut (RPMI), le Phosphate-Buffered Saline (PBS), les antibiotiques, le lipopolysaccharide de E. coli E026 :B6 (LPS), le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium (MTT), la glutamine, le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'ester méthylique de l'acide acétobromo- $\alpha$ -D-glucuronique.

## II. Méthodes

### II.1. Caractérisation et quantification des stilbènes ainsi que de l'extrait

Les trois stilbènes utilisés dans l'étude à savoir le resvératrol, son dimère l' $\epsilon$ -viniférine et son tétramère la vitisine B, ainsi que la fraction ont été isolés et caractérisés au laboratoire à partir d'un extrait de sarments de vigne fourni gracieusement par la société Actichem (Montauban, France) selon la méthode décrite par Biais et al. (Biais et al., 2017).

La fraction (5) que nous appellerons extrait dans la suite de nos travaux contenait deux stilbènes principaux, la  $\epsilon$ -viniférine et le resvératrol (468 et 265 mg/g de la fraction, respectivement), et quatre autres : le miyabénol C, la  $\omega$ -viniférine, la  $\delta$ -viniférine et la vitisine B (Biais et al., 2017) (Tableau 7). Nous avons effectué une caractérisation et quantification de l'extrait par UHPL-DAD-MS et confirmer les concentrations obtenues par Biais.

**Tableau 10:** Quantification et caractérisation de l'extrait selon Biais et al. (2017)

	fractions				
	2	3	4	5	6
total mass (g)	29.0	4.2	2.6	20.5	2.4
ampelopsin A	78 ± 4	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	nd	nd
pallidol	42 ± 5	4 ± 3	nd	nd	nd
piceatannol	0.5 ± 0.1	70 ± 5	26 ± 3	nd	nd
resveratrol	nd	nd	nd	265 ± 42.8	nd
hopeaphenol	37 ± 3	nd	nd	nd	nd
isohopeaphenol	90 ± 5	nd	nd	nd	nd
vitisinol C	1 ± 0.4	29 ± 2	28 ± 2	nd	nd
<i>ε</i> -viniferin	nd	nd	21 ± 1	468 ± 36	24 ± 2
vitisin A	43 ± 9	75 ± 46	119 ± 8	nd	nd
miyabenol C	nd	183 ± 9	213 ± 14	18 ± 7	nd
<i>ω</i> -viniferin	nd	nd	nd	37 ± 11	nd
<i>δ</i> -viniferin	nd	nd	nd	9 ± 3	43 ± 18
vitisin B	nd	nd	16 ± 02	53 ± 5	nd
total stilbene (% m/m)	29.5	36.1	55.0	85.0	6.7

Le resvératrol et ses métabolites, l'*ε*-viniférine et la vitisine B ont été préparés en solution stock à 40mM dans du DMSO à 100 % (sauf indications contraires), puis conservés sous forme d'aliqots à -20°C en vue des différentes expériences. Avant chaque expérimentation, la concentration des solutions des différents stilbènes a été vérifiée en UHPLC-DAD-MS.

## II.2. Obtention des métabolites du resvératrol

Les métabolites glucuronidés du resvératrol à savoir le resvératrol-3-O-glucuronide et le resvératrol-4'-O-glucuronide ont été produits par hémisynthèse au laboratoire (voir ci-dessous pour la méthode de synthèse), tandis que le resvératrol-3-O-sulfate a été obtenu auprès de la société Sigma-Aldrich

### II.2.1. Production des métabolites du resvératrol par hémisynthèse chimique

Pour identifier les principaux métabolites glucuronidés du resvératrol et tester leurs activités biologiques, il fallait une quantité relativement importante de matériel. Ainsi, nous avons procédé à la production par hémisynthèse chimique des métabolites glucuronidés du resvératrol. La réaction nécessitait trois composés à savoir le resvératrol, un acide et une base. Le principe de la méthode d'hémisynthèse consistait à réaliser une réaction de substitution aléatoire directe entre le sel de RES et un donneur de glycosyle convenablement protégé (ester méthylique d'acide acétobromo- $\alpha$ -D glucuronique). Les groupes protecteurs d'acétyle sur la partie glycosyle permet d'assurer la formation des métabolites  $\beta$ -D-glucuronide souhaités.

Dans un premier temps, nous avons dû optimiser la méthode en faisant varier plusieurs paramètres à savoir les bases à utiliser et les équivalences en acide et base, et le temps de la réaction afin d'obtenir un meilleur rendement. Une fois la méthode optimisée, nous avons procédé au protocole de synthèse.

La synthèse des glucuronides de resvératrol a été réalisée selon la procédure suivante. Brièvement le resvératrol (100 mg, 1eq) a été dissous dans l'éthanol à température ambiante. Pour convertir les produits de synthèse en sels de potassium, du  $K_2CO_3$  (8 eq) ont été ajoutés lentement goutte à goutte et la solution a été agitée puis incubée pendant 30 min à 50°C. Après 30min, une solution d'ester méthylique de l'acide acétobromo-alpha-D glucuronique (176 mg, 1 eq) dans du MeOH (1 ml) a été ajoutée lentement au mélange réactionnel qui a été incubé pendant 72H. Le mélange réactionnel a été homogénéisé tous les 12H (dans les 1ères 24H de la réaction) afin d'éviter la présence des phases non-miscibles. Après 72H, la réaction a été arrêtée avec de l'eau acidifiée en ramenant le pH de la solution entre 5 et 6.

Le solvant du mélange réactionnel contenant les conjugués de resvératrol a été évaporé à sec par évaporation rotative, puis lyophiliser. Le solide brut a été séparé par HPLC semi-préparative pour obtenir les glucuronides de resvératrol, souhaités (cf paragraphe suivant). L'identification et la quantification des glucuronides a été réalisé par UHPLC-DAD-MS.

### II.2.2. Purification des métabolites du resvératrol par HPLC-sémi-préparative

#### *II.2.2.a. Extraction liquide/liquide*

Avant la purification par HPLC-sémi-préparative, l'extrait brut d'hémisynthèse a subi une étape d'extraction liquide/liquide avec deux solvants non miscibles (acétate d'éthyle/eau). Les métabolites glucuronidés étant majoritairement dans la phase aqueuse, nous avons réalisée 6 cycles d'extraction avec de l'eau dans une ampoule à décanter, suivi de deux extractions à l'acétate d'éthyle afin de récupérer le resvératrol n'ayant pas réagi. Les phases aqueuses ont été réunies, évaporées et reprises dans un mélange méthanol /eau (50/50) avant d'être injectées en HPLC-semi-préparative pour la purification des glucuronides.

#### *II.2.2.b. Purification par HPLC-sémi-préparative*

Les métabolites glucuronidés du resvératrol ont été purifiés à partir de l'extrait aqueux obtenu après hémisynthèse chimique par HPLC sémi-préparative. L'appareil utilisé était une HPLC-

semi-préparative Prostar 325, (Varian, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un détecteur UV-VIS. L'élution a été réalisée sur une colonne C18-100 (10mm x 250 mm, 5 µm) avec un débit de 2 mL/min. La méthode a été dans un premier temps optimisée afin d'augmenter la quantité injectée et ainsi de diminuer le nombre d'injections nécessaires pour purifier la totalité de la production. Des conditions optimisées de la HPLC semi-préparative ont été obtenues en modifiant le gradient.

Une fois l'optimisation de la méthode terminée, nous avons réalisé la purification des métabolites contenu dans l'extrait aqueux dans les conditions suivantes. Brièvement, l'extrait aqueux a été solubilisé dans du méthanol/eau (50/50 ; v/v) à une concentration finale de 12 mg/mL. Les échantillons ont été filtrés à l'aide de filtres seringues de 0,45 µm et le volume d'injection variait de 0,5 ml à 0,8 mL. L'extrait a ensuite été élué avec un débit de 2 mL/min en utilisant de l'eau ultrapure non acidifiée (solvant A) et de l'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution était le suivant : 13% B (0min), 13-25% (0-13 min), 25% (13-20 min), 25-30% (20-22 min), 30-100% (22-25 min), 100% (25-30 min), 100-13% (30-31 min). L'éluât a été surveillé à 280 et 306 nm et les fractions ont été automatiquement collectées. Les temps de rétention HPLC pour les conjugués RES était de 15, 18 min pour R4'G, R3G, respectivement. Les pics correspondant aux métabolites RES respectifs ont été collectés individuellement à partir de chaque série chromatographique et mis en commun. Les fractions de métabolites regroupées ont ensuite été évaporées sous pression réduite au rotavapeur et séchées sous vide au lyophilisateur. Une portion des composés purifiés a été utilisée pour les analyses en UHPLC-DAD-MS comme décrit précédemment pour s'assurer de la pureté des pics à 280 et 320 nm. Leur pureté a été estimée à  $\geq 95$  %.

#### II.2.2.c. Identification des stilbènes par UHPLC-DAD-SM

L'analyse des stilbènes a été réalisée à l'aide d'une UHPLC Agilent Technologies série 1290 Infinity (Santa Clara, Canada) équipé d'un module d'échantillonnage automatique, d'une pompe binaire, d'un dégazeur, d'un réchauffeur/sélecteur de colonne et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) fonctionnant de 190 à 950 nm. L'UHPLC est couplé à un spectromètre de masse à Trap ionique Esquire 6000 (Agilent Tech, Santa Clara, CA) fonctionnant en mode ESI négatif et positif. Les spectres de masse ont été enregistrés sur la plage de m/z 130-1400. Les séparations analytiques ont été réalisées sur une colonne Agilent SB-C18 (diamètre interne de 2,1 mm x 100 mm, taille de particules 1,8 µm) à un débit de 0,35 mL/min. La phase mobile consistait à de l'eau acidifiée (acide formique à 0,1 %) comme solvant A et de l'acétonitrile

acidifié (acide formique à 0,1 %) comme solvant B. Les solvants étaient dégazés avant utilisation. Les stilbènes et les métabolites étaient analysés à différentes concentrations après solubilisation dans un mélange méthanol/eau (1/1, v/v) en utilisant le gradient suivant : 90 % A, 10 % B (0 à 1,7 min), 80 % A, 20 % B (3,4 min), 70 % A, 30 % B (5,1-6,8 min), 65 % A, 35 % B (8,5 min), 40 % A, 60 % B (11,9 min), 100 % B (15,3-17 min), 90 % A, 10 % B (17,3 min) et 10 % B (17,3-20 min)

### **II.3. Expérimentations acellulaires**

Pour les expérimentations acellulaires, 3 différents tests antioxydants ont été effectués, à savoir le piégeage du radical DPPH, la mesure du pouvoir réducteur par le test FRAP et le piégeage du monoxyde d'azote (NO).

#### **II.3.1. Test de piégeage DPPH**

La méthode DPPH est la méthode antioxydante la plus utilisée en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa reproductibilité. Cette méthode est basée sur le piégeage du radical chromogène DPPH instable de couleur violette qui est réduit par les composés antioxydants en un composé hydrazine stable de couleur jaune pâle.

Le test DPPH a été légèrement modifié par rapport à celui décrit par Blois (Blois, 1958). Le radical DPPH stable a été dissous dans du méthanol à la concentration finale de 200  $\mu\text{M}$ . Le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, la vitisine B et leurs combinaisons équimolaires ont été préparés à différentes concentrations allant de 100 à 400  $\mu\text{M}$ . Concernant les combinaisons équimolaires de stilbènes, par exemple, la combinaison de RSV+VNF à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  contient 50  $\mu\text{M}$  de resvératrol et 50  $\mu\text{M}$  de l' $\epsilon$ -viniférine. La fraction enrichie en stilbènes contient des quantités équimolaires de resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine et a été préparée selon les mêmes modalités que le mélange de RSV+VNF. Les différentes solutions de stilbènes et leurs combinaisons ont été préparées dans un mélange méthanol/eau (50/50). Un volume de 50  $\mu\text{L}$  de la solution de polyphénols seuls ou en combinaison a été mélangé avec un volume de 150  $\mu\text{L}$  de solution DPPH dans une plaque 96 puits afin d'obtenir une concentration finale allant de 25 à 100  $\mu\text{M}$ . Ce mélange a ensuite été incubé pendant 20 minutes dans l'obscurité à 37°C. Le trolox, un agent antioxydant reconnu a été utilisé à titre de contrôle positif à des concentrations finales allant de 12,5 à 50  $\mu\text{M}$  dans les mêmes conditions. Les radicaux DPPH ont ensuite été quantifiés par spectrophotométrie à 520 nm (CLARIOstar, BMG LABTECH, Champigny-sur-

Marne, France). L'activité antioxydante des stilbènes seuls ou en mélange est alors représentée par la diminution de la quantité de radical DPPH. Les résultats ont été exprimés en IC<sub>50</sub>, qui représente la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire la quantité de radicaux DPPH de 50 %.

### II.3.2. Mesure de la réduction du fer ferrique par le test FRAP

Le test antioxydant FRAP est une méthode de complexation basée sur le mécanisme de transfert d'électrons. Ce test mesure la capacité des antioxydants à réduire un complexe ferrique [Fe (III)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> en complexe ferreux [Fe (II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> de couleur bleue en milieu acide.

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Benzie et Strain avec quelques modifications (Benzie & Strain, 1996). Le réactif FRAP a été fraîchement préparé à partir de tampon acétate (0,3 M, pH = 3,6) et mélangé avec du TPTZ (10 mM dans HCL) et du chlorure de fer hexahydraté (20 mM) dans un rapport 10 : 1 : 1. Les stilbènes ainsi que leurs combinaisons ont été dissous dans un mélange éthanol/eau (50/50). Brièvement, le resvératrol, l'ε-viniférine, la vitisine B, leurs combinaisons équimolaires ainsi que la fraction enrichie en stilbènes ont été préparés à différentes concentrations allant de 50 à 600 μM. Concernant les combinaisons équimolaires de stilbènes, par exemple, la combinaison de RSV+VNF à la concentration de 100 μM contient 50 μM de resvératrol et 50 μM de l'ε-viniférine. Un volume de 10 μL de chacune des solutions a été mélangé avec 190 μL de réactif FRAP dans une plaque 96 puits afin d'obtenir une concentration finale allant de 2,5 à 30 μM. Le mélange a ensuite été incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Le trolox, un agent antioxydant reconnu a été utilisé à titre de contrôle positif à des concentrations finales allant de 2,5 à 15 μM dans les mêmes conditions. Le pouvoir réducteur FRAP a été estimé en mesurant l'apparition complexe ferreux [Fe (II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> de couleur bleue à 593 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France). Les résultats ont ensuite été exprimés en IC<sub>50</sub>, en considérant une concentration de trolox de 300 μM comme 100 % de la réduction du complexe ferrique [Fe (III)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>.



### II.3.3. Test de piégeage du monoxyde d'azote

Ce test est basé sur le piégeage du radical NO libéré par le nitroprussiate de sodium ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ , ou SNP) après une exposition lumineuse. Le SNP est un complexe inorganique photosensible de couleur rouge, soluble dans l'eau et l'éthanol. Une stimulation du SNP par la lumière à une longueur d'onde comprise entre 314 et 576 nm déstabilise la liaison du NO avec le fer, induisant la photo-éjection du NO (Silvia & Marcelo, 2001). Le NO est ensuite quantifié à l'aide du réactif de Griess. Ce réactif est composé d'un groupement sulfanilamide et d'un groupement 1-naphtylamine. La réaction se produit en deux étapes. Lors d'une première étape, l'ion nitrite va réagir avec les sulfanilamides pour former un sel de diazonium (diazotation). Lors de la deuxième étape, le sel de diazonium va réagir avec la 1-naphtylamine pour former un composé de couleur rose qui est quantifiable par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en nitrite, elle reflète la concentration en NO dans l'échantillon. La concentration en NO dans l'échantillon est obtenue à l'aide d'une droite d'étalonnage en  $\text{NaNO}_2$ .

Lors de ce travail, cette méthode a nécessité l'optimisation de différents paramètres dont les conditions d'excitations lumineuses qui comprenaient le type, l'intensité lumineuse et le temps d'exposition à la lumière ainsi que la concentration en SNP.

Après optimisation, la méthode de dosage du NO est la suivante. Le SNP a été dissous dans de l'eau à la concentration finale de 5 mM. Le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, la vitisine B et leurs combinaisons équimolaires ainsi que la fraction enrichie en stilbènes ont été préparés à différentes concentrations allant de 50 à 800  $\mu\text{M}$  dans un mélange méthanol/eau (50/50). Concernant les combinaisons équimolaires de stilbènes, par exemple, la combinaison de RSV+VNF à la concentration de 100  $\mu\text{M}$  contient 50  $\mu\text{M}$  de resvératrol et 50  $\mu\text{M}$  d' $\epsilon$ -viniférine. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de chacune des solutions contenant les stilbènes ou les mélanges a été mélangé avec 200  $\mu\text{L}$  de SNP afin d'obtenir la concentration finale allant de 25 à 400  $\mu\text{M}$ . Le mélange a ensuite été exposé à une source de lumière contrôlée (lampe au tungstène de 5 600 lux) pendant 20 min à température ambiante. À la fin de l'exposition, un volume de 60  $\mu\text{L}$  de la réaction a été prélevé auquel a été ajouté 60  $\mu\text{L}$  de réactif de Griess. Après une incubation de 15 minutes, l'absorbance du complexe formé a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar (BMG LABTECH, Champs-sur-Marne, France). Les résultats ont été exprimés en  $\text{IC}_{50}$ , qui correspond à la concentration inhibitrice de l'échantillon nécessaire pour diminuer de 50 % la production de NO.

## II.4. Expérimentations cellulaires

### II.4.1. Entretien des cultures cellulaires

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM contenant 10 % de FBS inactivé par la chaleur et 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml) et placées dans un incubateur maintenu à 37°C dans une atmosphère humidifiée de 95 % air et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les repiquages des cellules sont effectués deux fois dans la semaine dans des flask de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Cambridge, MA, USA) lorsqu'elles arrivent à sub-confluence. Brièvement, les cellules sont rincées avec du PBS puis décollées à l'aide d'un grattoir stérile. Elles sont ensuite remises en suspension dans le milieu DMEM à la concentration de 8 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Toutes les expériences de ce travail ont été réalisées entre le 6<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> repiquage des cellules.

### II.4.2. Mesure de la viabilité cellulaire (test MTT)

La viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTT qui est basé sur la réduction colorimétrique du MTT. Les cellules vivantes et métaboliquement actives transforment le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) hydrosoluble de couleur jaune en cristaux de formazan non solubles de couleur violette. Cette réaction se fait *via* une succinate déshydrogénase mitochondriale présente dans les cellules métaboliquement actives. A la fin de la réaction, les cristaux violets obtenus sont dissous dans le DMSO, et l'intensité de la coloration violette est alors proportionnelle à la concentration de cellules vivantes dans l'échantillon.

Les cellules RAW 264.7 sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 60.000 cellules/puits. Après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées avec un lipopolysaccharide bactérien (LPS) à la concentration de 1µg/ml en présence ou absence de resvératrol, d'ε-viniférine, de vitisine B seuls ou en combinaisons équimolaires, ou de la fraction enrichie en stilbènes à des concentrations croissantes. Après 24h d'incubation, les cellules sont rincées avec une solution de PBS, puis le réactif MTT est ajouté (200µL d'une solution à 0,5 mg/mL) pendant 3h dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, la solution de MTT est retirée, puis les cristaux de formazan formés sont dissous dans 100 µl de DMSO à 100 %. Après une incubation à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante, l'absorbance du dérivé de formazan est mesurée à 570nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar (BMG LABTECH, Champs-sur-Marne, France). Les résultats sont alors exprimés en pourcentage de viabilité en prenant comme témoin les cellules n'ayant reçu aucun traitement.

#### II.4.3. Mesure de la production de monoxyde d'azote

La production de monoxyde d'azote par les macrophages dans les surnageants cellulaires a été mesurée à l'aide du réactif de Griess. La production de monoxyde d'azote par les macrophages dans les surnageants cellulaires a été mesurée à l'aide du réactif de Griess dont la méthode a été décrite dans les paragraphes précédents.

Les cellules RAW 264.7 sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 60.000 cellules/puits. Après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées avec le LPS à la concentration de 1µg/ml en présence ou absence de resvératrol, d'ε-viniférine, de vitisine B seuls ou en combinaisons équimolaires, ou de la fraction enrichie en stilbènes à des concentrations croissantes. L'accumulation de nitrite dans le surnageant a ensuite été déterminée au bout de 24h à l'aide du réactif de Griess. Brièvement, un volume de 70 µL de surnageant a été mélangé avec un volume égal de réactif de Griess. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance du composé formé a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CLARIOstar (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France) et la concentration de NO a été calculée sur la base l'équation de la droite d'étalonnage obtenue avec du NaNO<sub>2</sub>.

#### II.4.4. Détermination des ROS intracellulaires

Les ROS intracellulaires ont été quantifiés à l'aide de la sonde 2',7'-dichlorofluorescéine-diacétate (DCFH-DA). La 2',7'-dichlorofluorescéine, également connue sous le nom de DCF, est un colorant fluorescent qui quantifie les radicaux hydroxyles, peroxydes et autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) formées dans les cellules. La sonde DCFHDA, lipophile, diffuse au travers des membranes cellulaires puis une fois dans la cellule est désacétylée par les estérases intracellulaires. Le produit désacétylé, la 2'7'-dichlorodihydrofluoresceine (DCHF), est sensible aux oxydants qui la transforme en un composé hautement fluorescent, la 2', 7'-dichlorofluorescéine (DCF). La DCF peut alors être quantifiée par fluorimétrie.

Les cellules RAW 264.7 sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une densité de 60.000 cellules/puits pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées avec le LPS à la concentration de 1µg/ml en présence ou absence de resvératrol, d'ε-viniférine, de vitisine B seuls ou en combinaisons équimolaires, ou de la fraction enrichie en stilbènes à des concentrations croissantes. Après 24h d'incubation, les cellules sont rincées avec du PBS froid, puis incubées pendant 30 minutes avec la sonde DCFHDA (5 µM) dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

L'intensité de fluorescence est ensuite mesurée à l'aide du lecteur de plaque CLARIOstar (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 528 nm, respectivement.

#### II.4.5. Déterminations des niveaux cellulaires de glutathion

La quantité de glutathion total (GSH et GSSG) produite par les RAW 264.7 a été déterminée en mesurant le rapport GSH/GSSG à l'aide du test de recyclage enzymatique décrit par Rahman et al. avec une légère modification.

Les cellules traitées au resvératrol (1-15  $\mu$ M) ont été lavées deux fois à l'aide de PBS glacé et gratté en utilisant 1 mL de tampon TPE (0,1 % de Triton X-100 + 0,6 % d'acide sulfosalicylique dans du KPE) et les cellules ont été récoltées.

Les macrophages ont ensuite subi une étape de lyse cellulaire : sonication pendant 3 minutes dans de l'eau glacée tout en effectuant un vortex toutes les 30, suivie de deux cycles de congélation-décongélation. Par la suite, 50 $\mu$ L de cellules ont été récupéré afin de déterminer la quantité de protéine par le dosage de Bradford.

Les cellules restantes ont été centrifugé à 14000 rpm pendant 5 min à 4 °C afin d'effectuer les dosages du GSH et GSSG

Pour déterminer le GSH, 20  $\mu$ l d'extrait cytosolique (lysats cellulaire) ou de GSH standard ou de blanc ont été ajoutés dans les puits désignés de la plaque de 96 puits. 120 $\mu$ L du mélange réactionnel DTNB + GR (1 : 1) ont ensuite été ajoutés dans chaque puits. Le GSH standard ainsi que le blanc ont été préparés dans le tampon de fond et traités de la même manière que les échantillons.

La plaque a ensuite été incubée pendant 30S afin que le GSSG puisse se transformer en GSH avant l'ajout de 60 $\mu$ L du NADPH. Après addition du NADPH, l'absorbance a été immédiatement lue sous un lecteur de microplaques CLARIOstar (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France) à 405 nm à des intervalles de 30 s pendant 2 min.

Pour déterminer les niveaux de GSSG, 100  $\mu$ L d'extrait cytosolique, de standard ou 100 $\mu$ L de KPE ont été incubés avec 2  $\mu$ l de 2-vinylpyridine (VPD), le mélange a ensuite été incubé pendant 1H à température ambiante. Par la suite, 6  $\mu$ l de triéthanolamine a été ajouté au mélange afin de neutraliser la VPD pendant 10 minutes. Après neutralisation, 20  $\mu$ L de lysats cellulaires ou de GSSG standard ont été testés comme décrit ci-dessus.

Les niveaux de GSH et de GSSG totaux ont été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec du GSH et GSSG authentique comme étalon. La concentration en protéines a été

déterminée à l'aide du dosage de Bradford en utilisant la BSA comme standard. Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéine.

#### II.4.6. Dosage du resvératrol dans les cellules RAW 264.7

Les concentrations des stilbènes ont été déterminées après traitement des cellules RAW 264.7 à la fois dans les compartiments intra et extracellulaires. Pour cela, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits à une densité de  $10^6$  cellules/puits. Après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées avec le LPS à la concentration de  $1\mu\text{g/ml}$  en présence ou absence de resvératrol, d' $\epsilon$ -viniférine, de vitisine B seuls ou en combinaisons équimolaires dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  en présence de 5% de  $\text{CO}_2$ . Après 24h de traitement, les cellules sont immédiatement placées sur la glace.

Une fois les cellules placées sur la glace, 1 mL de surnageant a été prélevé puis centrifugé à 14000 rpm pendant 20 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Un volume de 50  $\mu\text{L}$  du surnageant a ensuite été mélangé avec 50 $\mu\text{L}$  de méthanol avant son analyse par UHPLC-DAD-MS. Une courbe d'étalonnage des différents stilbènes (1 à 50  $\mu\text{M}$ ) a été réalisée en parallèle afin de quantifier les stilbènes présents dans l'échantillon.

#### II.4.7. Évaluation des interactions par la méthode des indices de combinaisons (IC)

Les études des interactions des stilbènes entre eux dans les différents tests acellulaires et cellulaires ont été évaluées par la méthode de l'indice de combinaison de Chou et Talalay à l'aide du logiciel CompuSyn 2.0 (ComboSyn Inc., Paramus, USA). Pour les différentes expérimentations, chaque stilbènes individuels et leurs combinaisons équimolaires ont été testés au préalable à différentes concentrations afin de déterminer la concentration exerçant leur effet médian ( $\text{IC}_{50}$ ). Une fois les  $\text{IC}_{50}$  déterminées, nous avons sélectionné une gamme de concentrations qui entourent les  $\text{IC}_{50}$  déterminées pour les composés individuels. Les valeurs des concentrations et les effets correspondants à chacune d'entre elles pour les stilbènes individuels ainsi que leurs combinaisons ont ensuite été saisis dans le logiciel CompuSyn qui a calculé les indices de combinaisons (IC) pour les niveaux d'effets à 50 %. Sur la base de la théorie de l'IC, les effets de ces combinaisons ont été définis quantitativement comme tel : IC

$< 0,9$ ,  $0,9 \leq IC \leq 1,1$  et  $IC > 1,1$  respectivement pour une interaction synergique, additive et antagoniste (Chou, 2006).

### **II.5. Analyses statistiques**

Pour chaque expérience, quatre réplicas ont été réalisés par condition testée. Toutes les expériences ont été réalisées au moins quatre fois. Les données présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type sont celles d'une expérience représentative. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, USA). Les données ont été analysées par une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle suivi d'un test post-hoc de Tukey. Les différences ont été considérées significatives pour une valeur de  $P < 0,05$ .

**Chapitre I : Etude des activités antioxydantes du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B seules ou en mélange sur un système acellulaire**

## I. Contexte général et objectifs du chapitre I

Lorsque les ROS sont générés en excès et que les systèmes de défenses antioxydants de l'organisme ne sont plus capable de les neutraliser, il apparait un déséquilibre redox nommé stress oxydatif. Ce stress endommage les composants cellulaires tels que l'ADN/ARN, les protéines et les lipides, pouvant ainsi entraîner une mort cellulaire. Ce stress oxydatif est impliqué dans l'accélération du processus normal de vieillissement cellulaire, mais également dans le développement de diverses pathologies chroniques, comme les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, les cancers (Schieber & Chandel, 2014).

Les principales espèces réactives dérivées de l'oxygène sont représentées par l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le monoxyde d'azote (NO), le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ), et l'acide hypochloreux (HClO) (Biswas, 2016; Niki, 2016)

Un des moyens efficaces pour lutter contre le stress oxydatif est l'utilisation d'antioxydants exogènes comme les polyphénols. Un des mécanismes par lesquels les polyphénols exercent leur action met en jeu leurs capacités à donner des protons ou des électrons, permettant ainsi de réduire directement les radicaux libres. D'autres processus, plus lents mais plus efficaces, passent par une augmentation de la synthèse d'antioxydants endogènes enzymatiques tels que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion réductase ou encore l'hème oxygénase, et d'antioxydants non-enzymatiques, tels que le glutathion, la vitamine E et C.

Plusieurs méthodes sont classiquement utilisées pour évaluer la capacité antioxydante des composés naturels : le piégeage des radicaux 2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH $\cdot$ ), le piégeage des radicaux 2,2'-azino-bis(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS $^{\cdot+}$ ), le piégeage du NO, la mesure de la réduction des ions  $Cu^{2+}$  (CUPRAC), la mesure de la réduction des ions  $Fe^{3+}$  (FRAP), la capacité antioxydante d'équivalence Trolox (TEAC), la capacité d'absorption des radicaux oxygène (ORAC) (Benavente-García & Castillo, 2008; Gülçin, 2010; Gulcin, 2020). Ces méthodes mettant en jeux divers mécanismes antiradicalaires, il est souvent souhaitable d'utiliser plusieurs d'entre elles lors de l'évaluation de la capacité antioxydante.

Bien que plusieurs études aient rapporté la capacité antioxydantes des stilbènes en tant que molécules pures, à notre connaissance, une seule étude de Aftab et al. (2010), a évalué les interactions entre deux stilbènes, le resvératrol et l'oxyresvératrol (Aftab et al., 2010).



L'objectif du travail présenté dans ce chapitre a été de mesurer les capacités antiradicalaires du resvératrol (RSV), de l' $\epsilon$ -viniférine (VNF) et de la vitisine B (VB) et de les comparer à celles de ces mêmes composés lorsqu'ils sont présents en mélange ou au sein d'un extrait végétal plus complexe en utilisant trois méthodes antioxydantes, le piégeage du DPPH, du NO et le FRAP. Pour cela, nous avons dans un premier temps caractérisé et quantifié les stilbènes au sein d'extrait végétal, puis optimisé les méthodes de mesures des capacités antiradicalaires, plus particulièrement la méthode de piégeage du NO (non utilisée au laboratoire), avant l'évaluation des capacités antioxydantes.

## II. Caractérisation de l'extrait de vigne standardisé enrichi en stilbène

L'extrait de sarment de vigne standardisé enrichi en stilbène dans les différentes expériences, a été caractérisées et quantifiées par analyse UHPLC-DAD-MS en utilisant des standards. Les extraits ont été préparés à une concentration de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Un chromatogramme illustrant la composition de l'extrait à 100  $\mu\text{g/mL}$  est présenté dans la figure 11 et indique la présence de resvératrol, d' $\epsilon$ -viniférine et de vitisine B. Par la suite nous avons quantifié ces composés en utilisant les gammes étalons des trois molécules. L'extrait contient 33,7% de resvératrol, 63,1% d' $\epsilon$ -viniférine et 3,2% de vitisine B.

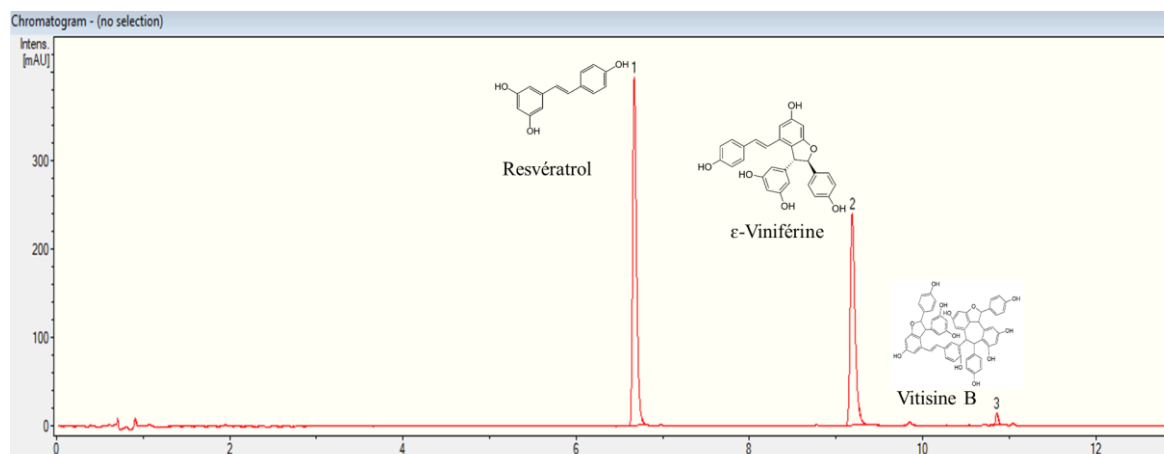


Figure 11: Chromatogramme de l'extrait de vigne standardisé enrichi en stilbène.

### III. Etude des activités antioxydantes de 3 stilbènes ainsi que de leurs interactions potentielles

#### III. 1. Développement et optimisation de la méthode de piégeage du monoxyde d'azote

Dans ce chapitre, nous utiliserons trois méthodes pour mesurer les capacités antioxydantes : le piégeage du DPPH, le piégeage du NO et la réduction du FRAP. La méthode du piégeage du NO n'étant pas utilisée au laboratoire, elle a nécessité un développement.

La méthode de piégeage du NO évalue la capacité antioxydante des molécules à piéger le NO libéré par le nitroprussiate de sodium (SNP) après exposition à la lumière. En présence de lumière, le nitroprussiate subit plusieurs réactions de photodécomposition donnant des produits de décomposition comme l'aquapentacyanoferrate, l'ion cyanure et l'oxyde nitrique (Figure 12) (Frank et al., 1976; William et al., 1984).

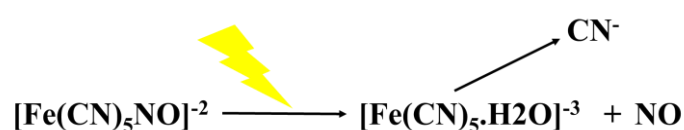


Figure 12: Mécanisme de la photodégradation du nitroprussiate (d'après William et al., 1984, modifié).

Les molécules représentées sont : le nitroprussiate  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{-2}$  ; aquapentacyanoferrate  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\cdot\text{H}_2\text{O}]^{-3}$  ; ion cyanure ( $\text{CN}^-$ ) ; monoxyde d'azote (NO).

Dans la littérature, les protocoles existants sont très différents les uns des autres notamment concernant la concentration en SNP (2,5 à 25mM), la durée d'exposition à la lumière (2,5 à 24H), le type de lumière (lumière naturelle ou artificielle) et la température d'exposition (25 à 37°C) (Tableau 8). Le développement d'une méthode rapide, reproductible, répétable nécessitait donc l'optimisation de ces différents paramètres.

**Tableau 11:** Etude comparative des différents paramètres utilisés dans la méthode de piégeage du NO

Concentration en SNP [mM]	Température et temps d'incubation	Type de lumière	Références
5	T° ambiante pendant 2,5H		Corrêa et al., (2018)
10	25° pendant 2,5H		Hazra et al., (2008)
5	25° pendant 3H	lumière polychromatique visible	Francis & Rew, (2010)
25	25°C pendant 3H		Man-Ying Chan et al., (2000)
10	30°C pendant 2H		Parul et al., (2013)
10	37°C pendant 24H		Eom et al., (2018)

La lumière étant un facteur capital pour la réalisation de l'expérimentation, nous avons alors testé deux paramètres : le type d'exposition lumineuse et le temps d'exposition lumineuse.

Concernant type d'exposition lumineuse, nous avons testé trois conditions pendant 30 minutes : l'obscurité, la lumière naturelle non contrôlé (environ 650 Lux) et la lumière artificielle contrôlée « faible » (450 Lux) et « intense » (4500 Lux). Nous avons constaté que l'exposition à l'obscurité ne permettait pas la libération du NO, contrairement à l'exposition aux deux autres sources lumineuses (Figure 13A). Nous avons donc conclu que la lumière était un facteur essentiel à la libération du NO. Par ailleurs, nous avons observé que la lumière naturelle, qui fluctue énormément en termes d'intensité puisqu'elle dépend de la saison (hivers, printemps, été, automne) et de l'heure de l'expérimentation dans la journée, ne nous permettait pas d'obtenir des productions de NO reproductible dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons ainsi choisi la lumière artificielle « intense » à 4500 Lux, qui nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles et une production importante en NO.

Nous avons ensuite optimisé le temps d'exposition (10 min, 20 min et 30 min) (Figure 13B). La condition 20 minutes a été choisie car il s'agit d'un temps intermédiaire pour lequel la concentration de NO libéré est comparable aux valeurs obtenues dans la littérature.

Le dernier paramètre à tester était la concentration en SNP (5 mM vs 10 mM). Nous avons remarqué que les deux concentrations de SNP libéraient la même concentration de NO. Cependant en ajoutant le resvératrol comme agent antioxydant, nous avons remarqué qu'il était capable de réduire la concentration de NO libéré par 5 mM de SNP de façon dose dépendante alors qu'il était inefficace lorsque le SNP était utilisé à 10mM. Par la suite, nous avons poursuivi l'optimisation de cette méthode en utilisant une concentration de SNP de 2,5 mM et avons montré qu'elle ne modifiait pas les résultats obtenus, et avons donc choisi cette concentration pour les expériences (Figure 13C).

En résumé, les paramètres optimaux pour la méthode de piégeage du NO sont une condition lumineuse contrôlée, dans notre cas une lumière artificielle ayant une intensité lumineuse de 4500 lux, avec un temps d'exposition de 20 min et une concentration en SNP de 2,5 mM. Ainsi la standardisation de cette méthode nous a permis d'avoir une méthode reproductible et moins chronophage que celles décrites dans la littérature qui utilisent des temps compris entre 2 et 24h.

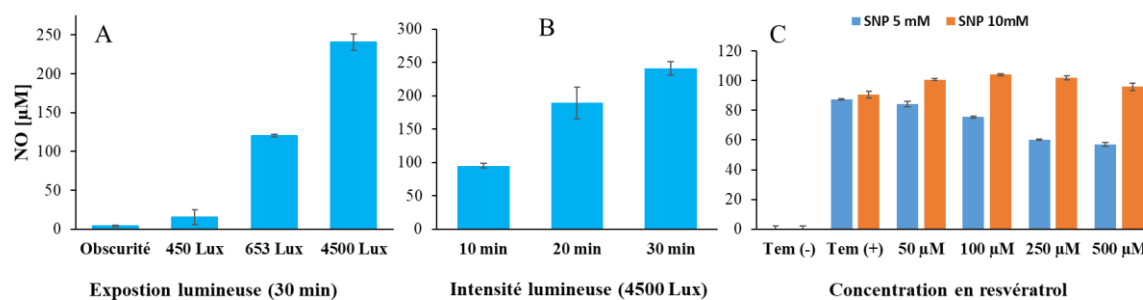


Figure 13: Optimisation des paramètres utilisés dans la méthode de piégeage du NO.

### III. 2. Etudes des effets antiradicalaires du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B ainsi que leurs mélanges équimolaires

Après l'optimisation de la méthode du piégeage du NO, nous avons évalué les activités antiradicalaires du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B ainsi que leurs mélanges équimolaires en utilisant une approche multi-méthodes.

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal **Molecules**.

#### **Resveratrol, $\epsilon$ -viniferin and vitisin B from vine: comparison of their *in vitro* antioxidant activities and study of their interactions**

Biranty Sy, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, and Arnaud Courtois.

Article

# Resveratrol, $\epsilon$ -viniferin and vitisin B from vine: comparison of their in vitro antioxidant activities and study of their interactions

 Biranty Sy <sup>1</sup>, Stéphanie Krisa <sup>1</sup>, Tristan Richard <sup>1,\*</sup> and Arnaud Courtois <sup>1,2,\*</sup>
<sup>1</sup> Université de Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, F 33140 Villenave d'Ormon, France ; biranty.sy@u-bordeaux.fr, stephanie.krisa@u-bordeaux.fr, tristan.richard@u-bordeaux.fr, arnaud.courtois@u-bordeaux.fr

<sup>2</sup> CHU de Bordeaux, Centre antipolice de nouvelle aquitaine, Bâtiment UNDR, F 33076, Bordeaux, France

 \* Co-corresponding authors: [tristan.richard@u-bordeaux.fr](mailto:tristan.richard@u-bordeaux.fr); [arnaud.courtois@u-bordeaux.fr](mailto:arnaud.courtois@u-bordeaux.fr)

**Abstract:** The control of oxidative stress with natural active substances could limit the development of numerous pathologies. Our objective was to study the antiradical effects of resveratrol (RSV),  $\epsilon$ -viniferin (VNF) and vitisin B (VB) alone or in a combination, and those of a standardized stilbene-enriched vine extract (SSVE). In the DPPH, FRAP, and NO scavenging assays, RSV present the highest activity with an IC<sub>50</sub> of 81.92±9.17, 13.36±0.91 and 200.68±15.40  $\mu$ M, respectively. All binary combinations resulted in additive interaction in the DPPH and NO scavenging assays. In the FRAP assay, synergic interaction for RSV+VNF, additive for VNF+VB and antagonistic for RSV+VB were observed. The ternary combination of RSV+VNF+VB elicited additive interaction in the DPPH assay and synergic interaction in the FRAP and NO scavenging assays. There was no significant difference between the antioxidant activity of the SSVE and the combination RSV+VNF. In conclusion, RSV presented the highest effects, followed by VNF and VB. Interactions revealed additive or synergistic effects, depending on the combination of stilbenes and the assay.

**Keywords:** Stilbenes; resveratrol;  $\epsilon$ -viniferin; vitisin B; interactions; antioxidant

## 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are co-products of normal cellular metabolism. Some of these species play an important role in cell signaling, differentiation, survival and death. These reactive species can exist in radical forms, containing one or more unpaired, non-radical electrons. ROS include superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and hypochlorous acid (HClO); RNS include nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) [1].

When these radicals are produced in excessive quantities, they can lead to oxidative or nitrosative stress. Oxidative stress is a physiological condition that occurs when the body's antioxidant defence systems (enzymatic or non-enzymatic) lose their ability to neutralize excess of reactive oxygen and nitrogen species, leading to oxidation of biological macromolecules such as nucleic acids, proteins and lipids. Numerous studies have shown that they are involved in the pathophysiology of numerous chronic diseases such as cardiovascular, inflammatory, metabolic, neurodegenerative diseases, and especially cancers [2].

In addition to endogenous antioxidant defence systems, protection against ROS/RNS involves exogenous antioxidants capable of preventing their formation or promoting their elimination. Plant-based foods and beverages are the main sources of antioxidants such as vitamins and phenolic phytochemicals. Dietary polyphenols are the most abundant antioxidants in our diet. The antioxidant effects of polyphenols are due to their reducing

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Molecules* **2022**, *27*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

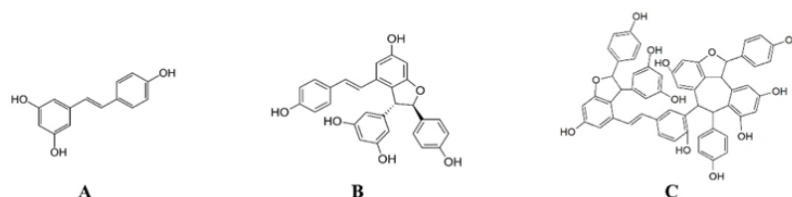


Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

power, by donating a hydrogen atom to a wide range of ROS, or by scavenging them. They also have the ability to chelate transition metals (Fe, Cu), thereby directly reducing the Fenton reaction and preventing oxidation caused by highly reactive hydroxyl radicals [3,4].

Numerous methods measure the antioxidant capacity. Those methods are based on the scavenging or reduction of free and stable radicals and are convenient to identify the various antioxidant mechanisms existing from one phenolic compound to another. These assays include the scavenging of NO, the reduction of ABTS, DPPH, or peroxide radicals in the ORAC methods, and the reduction of a ferric derivative to a ferrous iron derivative in the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. In studies that aimed to understand the nature of the antioxidant activities of natural compounds, it is interesting to use a multi-methods approach to evaluate the different mechanisms of action of antioxidants [5].

In food or nutraceuticals, compounds are present in complex mixtures and can therefore interact with each other. The resulting biological effect may then be the result of additive, synergistic or antagonistic interactions. Three types of interaction can occur: additivity, synergism or antagonism. Additivity occurs when the combination of two or more molecules gives an effect identical to the sum of the effects of the individual molecules, synergism when the effect of the combination is greater than the expected effect of the individual molecules, and antagonism when the effect of the combination is less than the expected effect of the individual molecules. Antioxidants can interact synergistically through a regenerative mechanism, i.e. one antioxidant regenerates the other. With regard to polyphenols, Aftab and Vieira highlighted a mechanism involving resveratrol in the regeneration of the reduced form of curcumin. Resveratrol is able to regenerate oxidized curcumin, thereby increasing the antioxidant activity of curcumin [6].



**Figure 1.** Molecular structures of stilbenes isolated from *Vitis vinifera* vine shoots. A, resveratrol; B,  $\epsilon$ -viniferin; C, vitisin B.

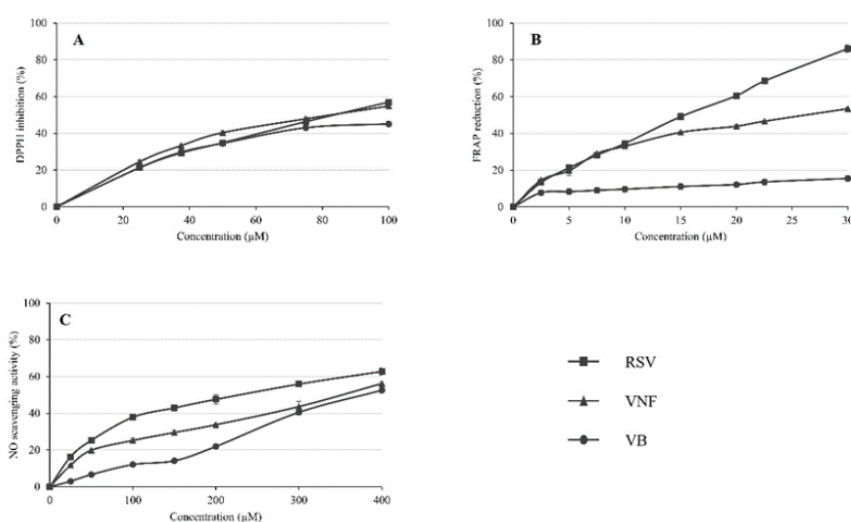
Stilbenes are polyphenols known for their antioxidant and anti-inflammatory activities [9–11]. The main compound of this family is resveratrol, whose oligomerisation can produce numerous stilbenes containing up to 8 resveratrol units. Numerous studies have shown their benefits, especially for resveratrol, in the prevention of diseases that involved inflammation and oxidative stress in their physiopathology.  $\epsilon$ -Viniferin (a resveratrol dimer), was also shown to exhibit antioxidant and anti-inflammatory, but also anti-proliferative, neuroprotective and anti-adipogenic properties [7]. By opposite, vitisin B (a resveratrol tetramer) is poorly studied, but some results suggested that this compound could exhibit similar properties or even to be more active than resveratrol [8]. In most studies on their biological activities, these compounds are used individually. However, in plants, they are present in mixtures in variable amount and proportions and their interactions are poorly studied. The aim of our study is to measure the antioxidant activities of three natural stilbenes, resveratrol (RSV),  $\epsilon$ -viniferin (VNF) and vitisin B (VB) individually and to compare these activities when these compounds are used in combination (Figure 1). These activities are also compared with those of a standardized stilbene-enriched vine extract (SSVE) obtained from *Vitis vinifera* vine shoots, known for its high antioxidant properties

[9]. This extract was characterized and contains, in mass, 33.7% RSV, 63.1% VNF and 3.2% VB [10]. The antioxidant activities were measured using the FRAP, NO and DPPH methods and the interactions between these compounds were obtained using the method of Chou and Talalay using CompuSyn software [11].

## 2. Results

### 2.1. Determination of antioxidant activities by the DPPH scavenging assay

The DPPH radical-scavenging antioxidant capacity of RSV, VNF and VB individually or in equimolar combinations are illustrated in Figure 2A and Figure 3. All the molecules and their mixtures showed antioxidant activities at the concentrations used in a dose-dependent manner. RSV had a DPPH radical scavenging capacity similar to VNF with IC<sub>50</sub> of 81.92±9.17µM and 80.12±13.79µM respectively, while VB was the least active molecule with an IC<sub>50</sub> of 129.14±26.13µM (Table 1). All combinations showed additive effects, since their CI were between 0.9 and 1.1 (Table 1).

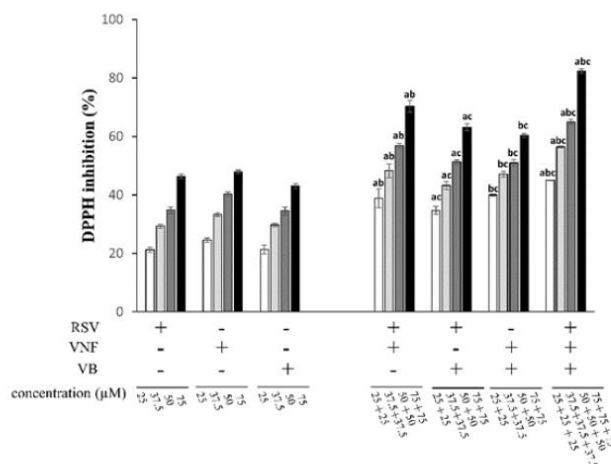


**Figure 2.** Antioxidant capacity of individual stilbenes (RSV, resveratrol; VNF, ε-viniferin; VB, vitisin B). A) DPPH assay. B) FRAP assay. C) NO scavenging assay.

**Table 1.** CI of the antioxidant capacities of grapevine stilbenes and their interactions using the DPPH, FRAP and NO scavenging methods.

107	DPPH			FRAP			NO			
	IC50 (µM)	CI	Interaction	IC50 (µM)	CI	Interaction	IC50 (µM)	CI	Interaction	
108	RSV	81.92±9.17		13.36±0.91			200.68±15.40			
109	VNF	80.12±13.79		28.81±4.15			338.35±89.47			
	VB	129.14±26.13		ND			368.80±14.20			
110	RSV+VNF	71.55±7.26	0.89±0.06	Ad	13.28±1.44	0.70±0.12	Sy	259.78±40.56	1.03±0.01	Ad
	RSV+VB	87.82±19.05	0.88±0.06	Ad	ND	1.36±0.34	An	243.07±52.03	0.87±0.13	Ad
111	VNF+VB	89.07±11.41	0.91±0.05	Ad	ND	0.96±0.20	Ad	ND	0.99±0.17	Ad
	RSV+VNF+VB	90.42±10.99	0.98±0.04	Ad	21.61±1.94	0.81±0.06	Sy	216.24±80.03	0.72±0.18	Sy

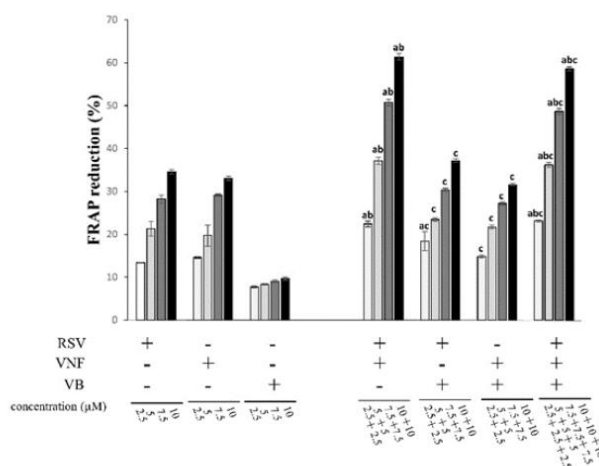
CI, combination index; Ad, additive; Sy, synergy; An, antagonism.



**Figure 3.** DPPH radical reduction antioxidant capacity of individual stilbenes (RSV, resveratrol; VNF,  $\epsilon$ -viniferin; VB, vitisin B) and their equimolar combinations. The 100 % represents the DPPH alone which was used as control. The result of a representative experiment is shown. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). Data were analyzed by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Each letter (a, b and c) indicated that the combinations were statistically different from the individual compounds (a for resveratrol, b for VNF and c for VB) according to post-hoc Tukey comparison test at  $P < 0.05$ .

2.2. Determination of antioxidant activities by the FRAP assay

The antioxidant capacity of RSV, VNF or VB and their equimolar combinations to reduce  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  is illustrated in Figure 2B and Figure 4. RSV and VNF showed dose-dependent antioxidant activities at the concentrations used. RSV showed the highest antioxidant capacity, with an  $IC_{50}$  of  $13.36 \pm 0.91 \mu M$ , followed by VNF at  $28.81 \pm 4.15 \mu M$ , while the  $IC_{50}$  for VB could not be reached at the concentrations tested in this study because of solubility troubleshooting's (Table 1). Two combinations RSV+VNF and RSV+VNF+VB showed synergistic effects, whereas combinations of RSV+VB showed antagonistic and VNF+VB showed additive effects (Table 1).



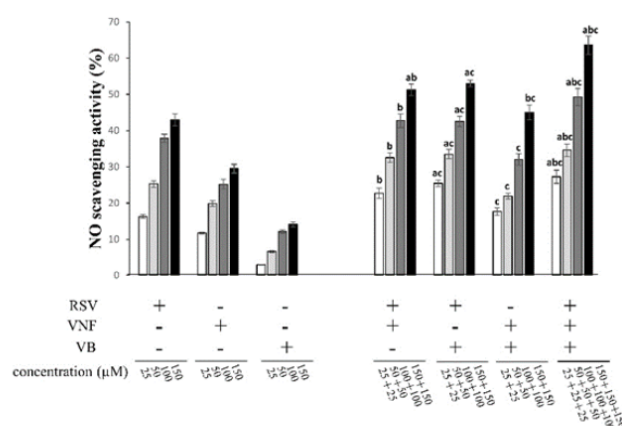
**Figure 4.** Ferric iron reduction capacity of individual stilbenes (RSV, resveratrol; VNF,  $\epsilon$ -viniferin; VB, vitisin B) and their equimolar combinations. The 100 % represents the trolox which was used as



a positive control. The result of a representative experiment is shown. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ). Data were analysed by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Each letter (a, b and c) indicated that the combinations were statistically different from the individual compounds (a for resveratrol, b for VNF and c for VB) according to post-hoc Tukey comparison test at  $P < 0.05$ .

### 2.3. Determination of antioxidant activity by NO scavenging assay

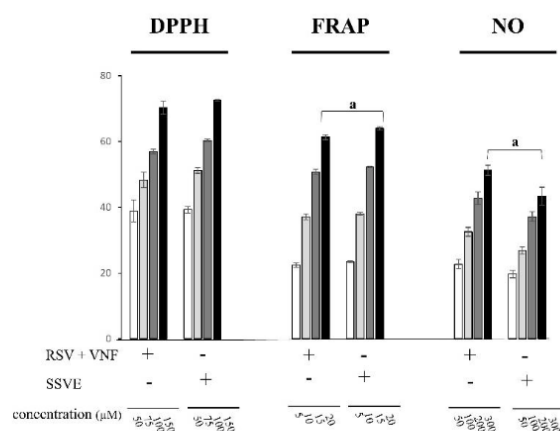
The antioxidant capacity of RSV, VNF or VB and their equimolar combinations to scavenge the NO radical is illustrated in Figure 2C and Figure 5. All the molecules reduced the amount of NO in a dose-dependent manner at the concentrations used. RSV had the highest NO scavenging activity, with an  $IC_{50}$  of  $200.68 \pm 15.40 \mu\text{M}$ , followed by VNF at  $338.35 \pm 89.47 \mu\text{M}$  and finally VB at  $368.80 \pm 14.20 \mu\text{M}$ . The RSV+VNF, RSV+VB and VNF+VB combinations had additive effects, whereas the combination RSV+VNF+VB had synergistic effect (Table 1).



**Figure 5.** NO scavenging capacity of individual stilbenes (RSV, resveratrol; VNF,  $\epsilon$ -viniferin; VB, vitisin B) and their equimolar combinations. The 100 % represents the SNP alone which was used as a positive control. The result of a representative experiment is illustrated. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ). Data were analysed by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Each letter (a, b and c) indicated that the combinations were statistically different from the individual compounds (a for resveratrol, b for VNF and c for VB) according to post-hoc Tukey comparison test at  $P < 0.05$ .

### 2.4. Comparison of the antioxidant activity between the combination RSV+VNF and the standardized stilbene-enriched vine extract

The antioxidant activities of the combination RSV+VNF were compared with those of the standardized stilbene-enriched vine extract (SSVE) in the different assays (DPPH, FRAP, NO scavenging) (Figure 6). The SSVE was previously characterized and mainly contains RSV and VNF. The only significant differences were observed at the highest concentrations in the FRAP and NO scavenging assay.

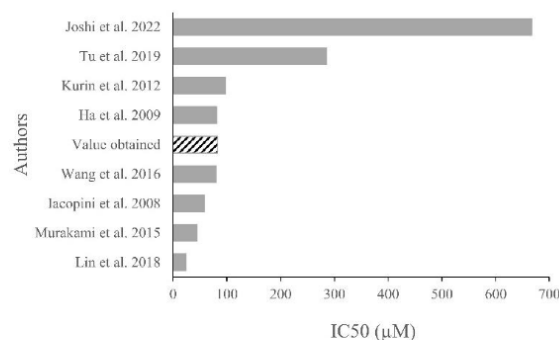


**Figure 6.** Comparison of the antioxidant activity between the combination (RSV+VNF) and the standardized stilbene-enriched vine extract (SSVE). Data were analyzed by ANOVA ( $p < 0.05$ ). a, indicated that the combination was statistically different from the SSVE according to post-hoc Tukey comparison test at  $P < 0.05$ .

### 3. Discussion

Our results show that RSV and VNF have antioxidant activities in the DPPH, FRAP and NO assays, whereas VB have antioxidant activities only in the DPPH and NO assays. RSV and VNF showed the highest antioxidant activities. In the literature, the antioxidant potential of RSV is well documented by the DPPH, FRAP and NO assays. On the other hand, few studies have evaluated the antioxidant potential of VNF and VB, and no studies using the FRAP and NO assays were reported, despite their *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities in cells culture [8]. In the literature, the RSV  $IC_{50}$  values obtained for the DPPH assay (the most widely used method for measuring its antioxidant activity) are highly variable (Figure 7). In our study, the RSV  $IC_{50}$  ( $81.92 \pm 9.17 \mu M$ ) is similar to that reported in the study of Ha et al. and the study of Wang et al. who obtain  $IC_{50}$  values of 81.2 and  $80.5 \mu M$ , respectively, but very different from those reported by Joshi et al. ( $667.18 \mu M$ ), Tu et al. ( $285.54 \mu M$ ) or Lin et al. ( $24.3 \mu M$ ) [12–16]. Three studies reported VNF  $IC_{50}$  between  $52.6 \mu M$  and  $92 \mu M$ , which is comparable to the VNF  $IC_{50}$  of our study ( $80.12 \pm 13.79 \mu M$ ) [9,12,17]. No study is available for VB.

In the FRAP and NO antioxidant assays, RSV is the most active molecule, followed by VNF and then VB, which shows much less activity. With regard to the FRAP assay, it is difficult to compare our results with those in the literature, as they are often expressed in a different manner. Nevertheless, a few studies calculate  $IC_{50}$  for RSV. In particular the studies by Lin et al., who obtained an  $IC_{50}$  of  $20.7 \mu M$ , which is very close to the  $IC_{50}$  of  $15.38 \mu M$  we obtained, but very different from the  $IC_{50}$  obtained by Kurin et al. and Skroza et al., which are  $162.02 \mu M$  and  $335.9 \mu M$  respectively [4,15,18].



**Figure 7.** Summary of IC<sub>50</sub> for resveratrol in the DPPH assay according to literature.

Very few studies of NO scavenging capacity have been carried out with RSV. Man-Ying Chan et al. showed that 50µM RSV in solution in the presence of ethanol inhibited NO by 46.2%, unlike our study where the inhibition was lower (25.3%) [19].

The antioxidant capacity of these three compounds was evaluated in the ORAC test by Biaies et al [10]. The authors concluded that VNF had the greatest antioxidant capacity, three times greater than the one of RSV and 21 times greater than the one of VB. In our study, the antioxidant activity of RSV is higher than VNF in two of the three assays used (FRAP and NO). One reason for this difference could be due to the reaction mechanisms involved. According to Huang et al., two chemical processes, shared by the majority of polyphenols, are responsible for their antioxidant effectiveness, namely hydrogen atom transfer and electron transfer [20]. The ORAC assay is based on hydrogen atom transfer, whereas the DPPH, FRAP and NO assays are based on electron transfer.

It is known that the more hydroxyl groups a molecule has, the stronger its antioxidant activity. In our study, RSV was as effective, if not more so, as compared to its dimer VNF and its tetramer VB, which possess the highest number of hydroxyl groups. This observation could be explained by the fact that RSV, by virtue of its structure, could release its protons more easily than VNF or VB. In the DPPH assay, some authors have stated that the steric accessibility of the DPPH radical is a major determinant of the reaction, so small molecules have better access to the radical site and therefore a higher antioxidant capacity. Conversely, large compounds react slowly, which could explain their lower activity [5,20].

A number of studies have been carried out on the interactions between RSV and other polyphenols. Most of them have shown antagonistic interactions in the DPPH assay. These antagonistic interactions have mainly been shown with polyphenols that belong to the flavonoids and phenolic acids families such as catechin, quercetin, caffeic acid, kaempferol and gallic acid [4,14,19,21]. In our study, the stilbenes were able to interact with each other in an additive manner. Those results suggest that within the same class of polyphenols, they appear to cooperate and potentiate their effects, whereas polyphenols that belong to different classes can sometimes exert antagonistic effects. Concerning the FRAP assay, we observed synergistic effect for the RSV+VNF combination, whereas when VB which was a less active molecule was combined with RSV, the effect was antagonistic. Here it could be assumed that VB interacted negatively with RSV by reducing its antioxidant activity. In the literature, Abraham et al. have found additive effects between RSV in combination with polyphenols such as chlorogenic acid, pelargonidin, and epigallocatechin gallate [22]. Similarly, Skroza et al. observed synergistic effects when RSV was combined with catechin or caffeic acid [18]. However, when it was combined with gallic acid or quercetin, the interactions led to antagonistic effects. Concerning the NO scavenging assay, combination of RSV with VNF or VB, gave additive effects. Kurin et al. observed

that the interaction of RSV with caffeic acid induced synergistic effect and the combination with quercetin induced an additive one [4].

To our knowledge, no study has been carried out to measure the interactions that involve VNF or VB, either between these two oligomers or with compounds belonging to other families. We showed that VNF that presents interesting antioxidant activities produced in combinations with RSV either additive or synergic interactions. Whereas, VB that presents much less antioxidant activities could not produce any synergic interaction but even antagonist ones. In the ternary combination, VB reduced the antioxidant activities of the mixture of RSV+VNF, e.g. the  $IC_{50}$  for the FRAP assay is  $21.61 \pm 1.94 \mu M$  (RSV+VNF+VB) versus  $13.28 \pm 1.44 \mu M$  (RSV+VNF).

Our results as well as those reported in the literature highlight that the nature of the interactions depends on the mixtures of compounds and also to the assay used to measure the antioxidant capacity. As an example, Skroza et al. have shown that interactions can be highly variable - additive, synergistic or antagonistic - depending on the compound mixed with RSV (gallic acid, caffeic acid, (+)-catechin or quercetin) [18]. In addition, Kurin et al. also showed that the combination of RSV and quercetin produced an antagonistic effect in the SRD, FRAP, DPPH and ABTS assays, an additive effect in the NO scavenging assay, and a synergistic effect in the NRD and RP assays [4].

Here, we mainly report additive interactions as the calculated combination index are close to 1. Only the combinations of RSV+VNF and RSV+VNF+VB gave rise to synergistic effects in the FRAP assay, and RSV+VNF+VB in the NO scavenging assay. Insofar as the calculated combination index are between 0.7 and 0.85, we qualify these interactions as weak synergism according to Chou [11]. We also observed an antagonistic interaction between RSV and VB in the FRAP assay that is moderate in nature according to the same author [11].

The standardized stilbene-enriched vine extract (SSVE), derived from a vine shoots extract, consists mainly of RSV and VNF, with a very small proportion of VB and unknown compounds. Our results have shown that the RSV+VNF combination exhibited similar antioxidant effects compared to the one observed for the SSVE in the DPPH, FRAP and NO scavenging assays. However, at the highest concentrations, the SSVE showed a statistically greater or less effect than the combination in the FRAP and NO scavenging assay, respectively. These observations show that the presence of some compounds, even in very low concentrations, can modify the nature of the interactions of the major compounds. Therefore, in order to estimate the nature of compound interactions within a mixture, it would appear necessary to characterize all the compounds present in the extract, even those present in very low concentrations.

Some authors have attempted to explain the mechanisms involved in the interactions. In the case of additive interactions, these authors assume that the molecules act independently of each other. Synergistic or antagonistic interactions, on the other hand, could be explained by a regeneration mechanism: either a less effective antioxidant regenerates the more effective one, which in turn exerts antioxidant activities, hence the phenomenon of synergy, or conversely, the more effective antioxidant regenerates the less effective antioxidant, which will in turn exert a weaker antioxidant activity, hence the phenomenon of antagonism [6,23,24]. In our study we could hypothesize that VB could be regenerated by either RSV or VNF when in combination and therefore produce an antagonistic effect.

Mixtures of compounds can give rise to interactions that can result in additive, synergistic or antagonistic effects. It seems clear that additive or synergistic interactions are beneficial in the field of human health insofar as they enable the same or even a greater effect to be obtained with lower doses of compounds. Conversely, antagonistic interactions are deleterious to the resulting effects. In our case, the mixture of stilbenes essentially produced additive or synergistic interactions. The SSVE we tested, containing a mixture of these stilbenes, would therefore tend to have a beneficial effect. This SSVE was obtained simply and rapidly in two steps (an extraction followed by a centrifugal partition chromatography separation step), which represents an advantage for the valorization of vine

by-products and their use for health applications. This last point obviously merits further investigation.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals

Iron chloride hexahydrate; 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl (DPPH); sodium nitroprusside (SNP); sodium acetate; 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (>=99% (TLC); (TPTZ) and Griess reagent were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) was purchased from Thermo-Fisher (Illkirch, France). Resveratrol (RSV),  $\epsilon$ -viniferin (VNF), vitisin B (VB) and standardized stilbene-enriched vine extract (*Vitis vinifera* grapevine shoot extract, named as SSVE in the following) were obtained in the laboratory from vine shoots using the method previously described. Briefly, grapevine shoot extract was fractionated using centrifugal partition chromatography with a two-phase solvent system that was composed of heptane, ethyl acetate, methanol, and water (1:2:1:2). Extract sample was injected for a single run that allowed to collect 7 fractions. These 7 fractions were analyzed by a UHPLC-ESI-MS/MS system to identify the RSV-, VNF- and VB-enriched fraction. This SSVE contains, in mass, 33.7% RSV, 63.1% VNF and 3.2% VB. The confirmation of the identification of each stilbene was performed by NMR [10].

### 4.2. DPPH Scavenging Assay

The DPPH assay has been slightly modified from that described by Blois [25]. In this test, the purple chromogenic radical DPPH is reduced by antioxidant compounds to a pale-yellow hydrazine compound. The stable DPPH radical (200 $\mu$ M) was dissolved in methanol. Briefly, RSV, VNF, VB and their equimolar combinations were prepared at different concentrations ranging from 100 to 400 $\mu$ M. As an example, 100 $\mu$ M of the combination RSV+VNF contain 50 $\mu$ M of RSV and 50 $\mu$ M of VNF. The stilbene enriched SSVE mainly contains 1/3 RSV and 2/3 VNF in mass that represent an equimolar quantity of RSV and VNF. Therefore, the SSVE was prepared at the same concentration as those used for the different combinations of stilbenes, i.e. 100 $\mu$ M of the SSVE contain 50.9 $\mu$ M of RSV and 47.9 $\mu$ M of VNF. The different solutions of stilbenes and their combinations were prepared in a mixture of methanol/water (50/50), and a volume of 50 $\mu$ L was mixed with 150 $\mu$ L of DPPH solution in a 96-wells plate in order to obtain the final concentration ranging from 25 to 100 $\mu$ M for individual compound. The plate was then incubated for 20 min in the dark at 37°C. Trolox was used as a positive control at concentrations ranging from 50 to 200 $\mu$ M under the same conditions. DPPH radical scavenging activity was estimated by measuring the absorption at 520 nm with a CLARIOstar spectrophotometer (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France), reflecting the quantity of DPPH radicals remaining in the solution. The results were expressed as IC<sub>50</sub>, which represent the concentration of the sample required to reduce the DPPH radicals amount by 50%.

### 4.3. FRAP assay

The reducing power of the samples was determined using a FRAP assay described by Benzie & Strain with a few modifications [26]. The FRAP assay, based on the electron transfer mechanism, measures the ability of antioxidants to reduce the ferric complex [Fe (III)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> to the blue ferrous complex [Fe (II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> in an acid medium. The FRAP reagent was freshly prepared from acetate buffer (0.3 M, pH=3.6) and mixed with TPTZ (10 mM in HCL) and iron chloride hexahydrate (20 mM) in a 10:1:1 ratio. The tested samples were dissolved in ethanol/water (50/50). Briefly, RSV, VNF, VB, their equimolar combinations and the SSVE were prepared at different concentrations ranging from 50 to 600 $\mu$ M, as described in the section *DPPH scavenging assay*. The different solutions of stilbenes and their combinations were prepared in a mixture of methanol/water (50/50), and a volume of 10 $\mu$ L was mixed with 190 $\mu$ L of FRAP reagent in a 96-wells plate in order to

obtain the final concentration ranging from 2.5 to 30  $\mu\text{M}$  for individual compound. The plate was then incubated for 30 min in the dark at room temperature. Trolox was used at concentrations ranging from 50 to 300  $\mu\text{M}$  as a positive control under the same conditions. The FRAP reducing power was estimated by measuring absorption at 593 nm using a CLARIOstar spectrophotometer (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France). The trolox concentration of 300  $\mu\text{M}$  was considered as the 100% of the reduction of the iron complex. The  $\text{IC}_{50}$  represent the concentrations of the samples required to reduce by 50% the iron complex.

#### 4.4. NO Scavenging Assay

The NO radical was measured using SNP, a compound that spontaneously releases NO in aqueous solution at physiological pH under light irradiation. The NO radical interacts with oxygen to generate nitrites, which are then measured using the Griess reagent. Briefly, RSV, VNF, VB, their equimolar combinations and the SSVE were prepared at different concentrations ranging from 50 to 800  $\mu\text{M}$ , as described in the section *DPPH scavenging assay*. The different solutions of stilbenes and their combinations were prepared in a mixture of methanol/water (50/50), and a volume of 200  $\mu\text{L}$  was mixed with 200  $\mu\text{L}$  of SNP (5mM) in order to obtain the final concentration ranging from 25 to 400  $\mu\text{M}$  for individual compound. The tubes were then exposed to a controlled light source (5600 lux tungsten lamp) for 20 min. At the end of the exposure, a 60  $\mu\text{L}$  aliquot of the reaction was sampled, to which 60  $\mu\text{L}$  of Griess reagent was added in 96-well plates. Absorbance was measured after 15 min at 540 nm using a CLARIOstar spectrophotometer (BMG LABTECH, Champigny-sur-Marne, France). The results were expressed as  $\text{IC}_{50}$ , which represent the concentration of the sample required to scavenge 50% of NO production.

#### 4.5. Statistical analysis and determination of the interactions

All DPPH, FRAP, NO scavenging experiments were repeated at least four times and results are presented as means  $\pm$  SEM of a representative experiment. Statistical tests were performed using a one-way ANOVA test followed by Tukey's post hoc multiple comparison test. The significance level was set at  $p < 0.05$ . Interactions were determined using the Chou-Talalay combination index method that quantitatively determines the synergism ( $\text{CI} < 0.9$ ), additivity ( $0.9 \leq \text{CI} \leq 1.1$ ) and antagonism ( $\text{CI} > 1.1$ ) of a mixture using CompuSyn software, version 1.0.1 [11].

## 5. Conclusions

This study explored the antioxidant activity of resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin and vitisin B alone or in combination to highlight their interactions. Resveratrol exerts the greater antioxidant activity, and interactions between resveratrol and its oligomers resulted in synergistic or additive effects. As for one given combination the nature of the interactions depends on the assay, it seems that the antioxidant activity of mixtures depends on the reaction mechanisms involved in the assay used. It is therefore essential to use a multiple approach to characterize the antioxidant capacity of a compound alone or in a mixture. Finally, the results observed with a grapevine extract confirm that the presence of some compounds, even in very low amount, can influence the total activity of a mixture, thus underlining that the prediction of the antioxidant capacity of an extract should be cautious without its exact composition.

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

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

**Acknowledgments:** The authors thank Actichem (Montauban, France) for providing the standardized stilbene-enriched vine extract.

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

## References

1. Biswas, S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 1–9, doi:10.1155/2016/5698931.
2. Prior, R.; Wu, X. Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am J Biomed Sci* **2013**, *5*, 126–139, doi:10.5099/aj130200126.
3. Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231–1246, doi:10.3390/nu2121231.
4. Kurin, E.; Mućaji, P.; Nagy, M. In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study. *Molecules* **2012**, *17*, 14336–14348, doi:10.3390/molecules171214336.
5. Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Methodological Aspects about in Vitro Evaluation of Antioxidant Properties. *Anal Chim Acta* **2008**, *613*, 1–19, doi:10.1016/j.aca.2008.02.047.
6. Aftab, N.; Vieira, A. Antioxidant Activities of Curcumin and Combinations of This Curcuminoid with Other Phytochemicals. *Phytother Res* **2010**, *24*, 500–502, doi:10.1002/ptr.2960.
7. Beaumont, P.; Courtois, A.; Atgié, C.; Richard, T.; Krisa, S. In the Shadow of Resveratrol: Biological Activities of Epsilon-Viniferin. *J Physiol Biochem* **2022**, *78*, 465–484, doi:10.1007/s13105-022-00880-x.
8. Nassra, M.; Krisa, S.; Papastamoulis, Y.; Kapche, G.D.; Bisson, J.; André, C.; Konsman, J.-P.; Schmitter, J.-M.; Mérillon, J.-M.; Waffo-Tégou, P. Inhibitory Activity of Plant Stilbenoids against Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Planta Med* **2013**, *79*, 966–970, doi:10.1055/s-0032-1328651.
9. Liu, W.-B.; Hu, L.; Hu, Q.; Chen, N.-N.; Yang, Q.-S.; Wang, F.-F. New Resveratrol Oligomer Derivatives from the Roots of Rheum Lhasaense. *Molecules* **2013**, *18*, 7093–7102, doi:10.3390/molecules18067093.
10. Biais, B.; Krisa, S.; Cluzet, S.; Da Costa, G.; Waffo-Tégou, P.; Mérillon, J.-M.; Richard, T. Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4952–4960, doi:10.1021/acs.jafc.7b01254.
11. Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 621–681, doi:10.1124/pr.58.3.10.
12. Ha, D.T.; Kim, H.; Thuong, P.T.; Ngoc, T.M.; Lee, I.; Hung, N.D.; Bae, K. Antioxidant and Lipooxygenase Inhibitory Activity of Oligostilbenes from the Leaf and Stem of *Vitis Amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, *125*, 304–309, doi:10.1016/j.jep.2009.06.019.
13. Wang, L.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zou, J.; Li, X. Biotransformation of Resveratrol: New Prenylated Trans-Resveratrol Synthesized by *Aspergillus* Sp. SCS10W2. *Molecules* **2016**, *21*, 883, doi:10.3390/molecules21070883.
14. Joshi, T.; Deepa, P.R.; Sharma, P.K. Effect of Different Proportions of Phenolics on Antioxidant Potential: Pointers for Bioactive Synergy/Antagonism in Foods and Nutraceuticals. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* **2022**, *92*, 939–946, doi:10.1007/s40011-022-01396-6.
15. Lin, J.; Li, X.; Chen, B.; Wei, G.; Chen, D. E-Configuration Improves Antioxidant and Cytoprotective Capacities of Resveratrols. *Molecules* **2018**, *23*, 1790, doi:10.3390/molecules23071790.
16. Tu, J.; Shi, D.; Wen, L.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Yang, J.; Liu, H.; Liu, G.; Yang, B. Identification of Moracin N in Mulberry Leaf and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food and Chemical Toxicology* **2019**, *132*, 110730, doi:10.1016/j.fct.2019.110730.
17. Agbadua, O.G.; Kúsz, N.; Berkecz, R.; Gáti, T.; Tóth, G.; Hunyadi, A. Oxidized Resveratrol Metabolites as Potent Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitors. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*, 1832, doi:10.3390/antiox11091832.
18. Skroza, D.; Generalić Mekinić, I.; Svilović, S.; Šimat, V.; Katalinić, V. Investigation of the Potential Synergistic Effect of Resveratrol with Other Phenolic Compounds: A Case of Binary Phenolic Mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis* **2015**, *38*, 13–18, doi:10.1016/j.jfca.2014.06.013.
19. Man-Ying Chan, M.; Mattiacci, J.A.; Hwang, H.S.; Shah, A.; Fong, D. Synergy between Ethanol and Grape Polyphenols, Quercetin, and Resveratrol, in the Inhibition of the Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway. *Biochemical Pharmacology* **2000**, *60*, 1539–1548, doi:10.1016/S0006-2952(00)00471-8.
20. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* **2005**, *53*, 1841–1856, doi:10.1021/jf030723c.
21. Iacopini, P.; Baldi, M.; Storch, P.; Sebastiani, L. Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, in Vitro Antioxidant Activity and Interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 589–598, doi:10.1016/j.jfca.2008.03.011.
22. Abraham, S.K.; Eckhardt, A.; Oli, R.G.; Stopper, H. Analysis of in Vitro Chemoprevention of Genotoxic Damage by Phytochemicals, as Single Agents or as Combinations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2012**, *744*, 117–124, doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.011.
23. Peyrat-Maillard, M.N.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *J Amer Oil Chem Soc* **2003**, *80*, 1007–1012, doi:10.1007/s11746-003-0812-z.

24. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4916–4922, doi:10.1021/jp037247d.
25. Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200, doi:10.1038/1811199a0.
26. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.

**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.



## IV. Discussion du chapitre I

Le contrôle du stress oxydatif par l'utilisation des antioxydants naturels issus des plantes représente une des potentielles stratégies dans la prévention de plusieurs pathologies chroniques. Si de très nombreuses études montrent les activités antiradicalaires du resvératrol, très peu se sont intéressées à celles de ses oligomères qui sont présents en quantité importante dans la vigne. De plus, les études sur les interactions potentielles entre ces composés sont quasi inexistantes.

De ce fait, le travail de ce chapitre avait pour objectif d'évaluer les activités antiradicalaires du resvératrol (RSV), d'un de ses dimères, l' $\epsilon$ -viniférine (VNF), et d'un de ses tétramères, la vitisine B (VB), puis d'élucider leurs interactions potentielles lorsqu'ils étaient utilisés en mélanges. Une approche multi-méthodes (test DPPH, test FRAP, et piégeage du NO) a été utilisée afin d'évaluer les différents mécanismes d'action de ces composés. Par la suite, une des associations RSV+VNF était comparée à un extrait de vigne standardisé enrichi en stilbène (SSVE).

Les résultats de la présente étude ont clairement montré que **le resvératrol présente des activités anti-radicalaires plus importantes que celles de ses oligomères**. A contrario, son tétramère montre les activités les plus faibles avec les trois méthodes utilisées. Une des hypothèses est qu'en raison de sa structure, le resvératrol a une plus grande facilité à libérer ses protons afin de réduire les radicaux libres, contrairement à ses oligomères possédant des structures chimiques plus complexes.

Nous avons ensuite évalué les effets des **interactions des stilbènes** lorsqu'ils étaient en mélanges équimolaires. Toutes les combinaisons binaires ont entraîné des interactions additives pour le piégeage du DPPH et du NO. Cependant avec le test FRAP, les associations binaires des stilbènes ont montré différentes interactions. En effet, des interactions synergique, additive, et antagoniste ont été observées pour les mélanges RSV+VNF, VNF+VB et RSV+VB, respectivement. Nous avons remarqué que la vitisine B, molécule la moins active, interagissait négativement dans un mélange binaire en réduisant les activités antiradicalaires comme le témoigne les associations dans la méthode FRAP. Il était intéressant de noter que l'association des trois molécules entraîne des effets synergiques pour deux des trois tests.

En comparant les activités antioxydantes de l'association RSV+VNF avec celles du SSVE, nous n'avons observé aucune différence significative aux faibles concentrations dans les tests FRAP et NO, et une très faible différence aux fortes concentrations utilisées. Quoi qu'il en soit, la prédiction de la capacité antioxydante d'un extrait doit nécessiter une caractérisation exacte de sa composition et une étude au préalable des interactions entre ses composés.

Quelques hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes impliqués lors des interactions entre les stilbènes. Les interactions additives pourraient s'expliquer par la somme des effets antioxydants indépendants des stilbènes. Les interactions synergiques ou antagonistes pourraient s'expliquer par un mécanisme de régénération : soit un antioxydant moins efficace régénère le plus efficace, qui exercera ses activités antioxydantes entraînant les phénomènes synergiques, soit à l'inverse, l'antioxydant le plus efficace régénère l'antioxydant le moins efficace, qui exercera à son tour une activité antioxydante plus faible, d'où les phénomènes d'antagonismes. Dans notre étude, nous pourrions émettre l'hypothèse que la vitisine B pourrait être régénérée par le resvératrol ou l' $\epsilon$ -viniférine lorsqu'ils sont combinés et produire ainsi un effet antagoniste.

En conclusion, les résultats de cet article montrent pour la première fois l'existence des interactions pour les activités antiradicalaires entre le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B. Ces interactions synergiques/additives suggèrent que les stilbènes coopéraient mutuellement entre eux en potentialisant leurs effets. Cette synergie qui augmente l'effet biologique pourrait permettre de réduire les doses utilisées et ce qui pourrait être d'un grand intérêt pour une application industrielle dans le cas d'extraits de plantes.

**Chapitre II : Etude des activités anti-inflammatoires et antioxydantes du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B et des métabolites du resvératrol dans des macrophages**

## I. Contexte général et objectifs du chapitre II

Il est connu que le stress oxydatif et l'inflammation sont deux mécanismes étroitement liés qui sont associés au développement de nombreuses maladies.

Dans le 1<sup>er</sup> chapitre, nous avons déterminé les effets des mélanges de stilbènes sur les activités antioxydants en nous focalisant sur une capacité antiradicalaire du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B. Ces modèles acellulaires étant non physiologiques et limités à un seul mécanisme d'action (activité antioxydante), nous avons choisi d'étudier les effets des stilbènes sur un modèle de macrophage : la lignée de cellules murines RAW 264.7. En effet, lorsque les macrophages sont activés par le LPS, ils libèrent différents médiateurs inflammatoires comme le monoxyde d'azote (NO), différentes cytokines, tels que le TNF- $\alpha$ , des interleukines pro-inflammatoires et des prostaglandines, mais ils libèrent également des ROS intracellulaires.

Comme nous l'avons décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, les stilbènes sont des composés qui vont subir un fort métabolisme après administration. Par exemple, le resvératrol se retrouve, dans la circulation systémique et dans différents organes, principalement sous forme conjuguée (glucurono- ou sulfo-conjugués).

Dans le second chapitre de ce manuscrit, seront évalués les effets individuels du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B ainsi que leurs effets combinés sur le processus inflammatoire et le stress oxydatif dans les macrophages induit par le LPS. De plus, les effets des trois principaux métabolites du resvératrol à savoir resvératrol-3-O-sulfate, resvératrol-3-O-glucuronide et le resvératrol-4'-O-glucuronide seront étudiés.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons, dans un premier temps, étudié la stabilité des stilbènes seuls et en mélanges dans les milieux de culture. Nous avons ensuite évalué leurs potentielles cytotoxicités sur le modèle cellulaire de macrophages. Puis, nous avons étudié les activités anti-inflammatoires et antioxydantes des différentes molécules, en ciblant l'inhibition de la production du NO, des ROS intracellulaires ainsi que la synthèse du glutathion.

## II. Etude des effets anti-inflammatoires et antioxydants des stilbènes dans des macrophages et évaluations des interactions

Les effets anti-inflammatoires et antioxydants du resvératrol, et dans une moindre mesure ceux de ses oligomères, dont l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B, ont été précédemment rapporté en tant que composés isolés dans différents modèles cellulaires et *in vivo* (Chang et al., 2017; Esatbeyoglu et al., 2016; Ha et al., 2018; Nassra et al., 2013; Vion et al., 2018; K.-T. Wang et al., 2011). Cependant, une seule étude, à notre connaissance, rapporte leurs effets anti-inflammatoires en combinaison (Wang et al., 2011).

### II.1. Etude de la stabilité des trois stilbènes dans les conditions de culture cellulaire

La stabilité du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B à 25  $\mu$ M, a été évaluée en plaçant ces composés pendant 48 h à 37°C dans le milieu de culture utilisé pour les cellules RAW 264.7.

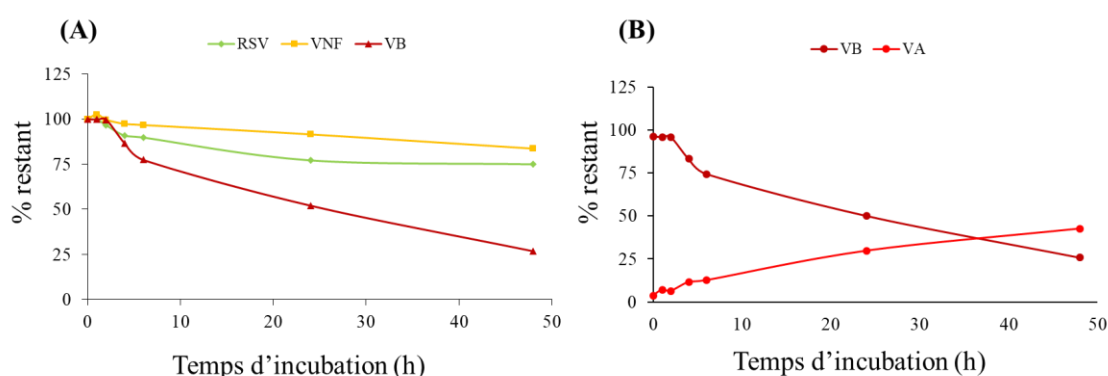


Figure 14: Stabilité des stilbènes dans le milieu de culture.

(A) Stabilité du resvératrol (RSV), de l' $\epsilon$ -viniférine (VNF) et de la vitisine B (VB) lors d'une incubation dans le milieu de culture cellulaire à 37°C de 0 à 48 h. (B) Cinétique de la disparition de la vitisine B et d'apparition de la vitisine A (VA).

Sur la base des analyses UHPLC-DAD-MS, nous avons observé que l' $\epsilon$ -viniférine est la molécule la plus stable dans ces conditions avec une diminution de 8,4% de sa concentration à 24 h et 16,2% à 48 h. La concentration de resvératrol décroît d'environ un quart en 24 h (22,9%), alors que la vitisine B décroît fortement (47,9% à 24 h et 73,2% à 48 h) (figure 14A).

Concernant la vitisine B, nous avons observé l'apparition d'un pic ayant le temps de rétention et le m/z de la vitisine A. Ainsi dans ces conditions expérimentales, la vitisine B se transforme en vitisine A (figure 14B).

## **II.2. Evaluation de la viabilité cellulaire des macrophages en présence des trois stilbènes et leurs mélanges**

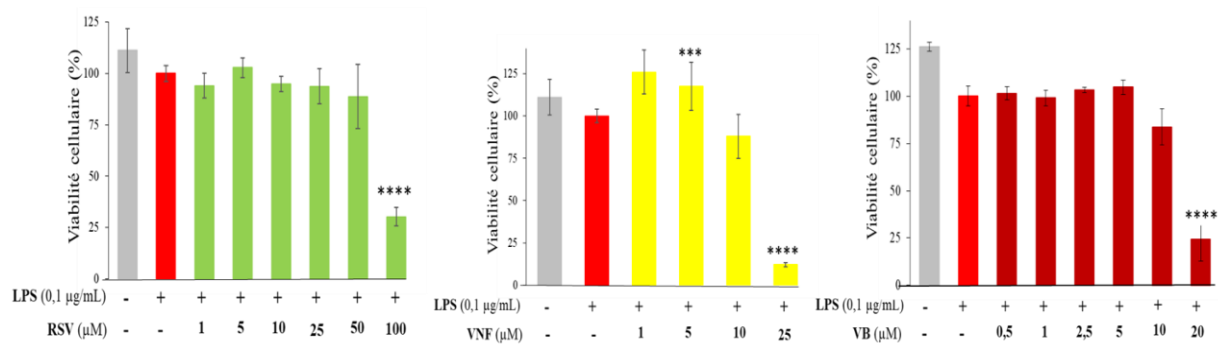
La mesure de la viabilité cellulaire permet de déterminer le seuil de toxicité des différentes molécules étudiées. Nous avons évalué la cytotoxicité des stilbènes individuellement, de leurs combinaisons binaires et ternaires à des concentrations allant de 0,5 à 100  $\mu\text{M}$ , dans les RAW 264.7 stimulées par le LPS. Le seuil de toxicité a été fixé à une viabilité inférieure à 80% par rapport au témoin LPS.

Les résultats, présentés dans la figure 15A, montrent que le resvératrol n'est pas cytotoxique jusqu'à 50  $\mu\text{M}$ , tandis que l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B diminuent la viabilité cellulaire pour des concentrations supérieures à 10  $\mu\text{M}$ . Les résultats du test de cytotoxicité montrent donc que le resvératrol est moins toxique que ses oligomères.

Les mélanges RSV+VNF, RSV+VB et VNF+VB montre une toxicité à partir de la concentration cumulée de 10  $\mu\text{M}$ , alors que le mélange ternaire ne présente pas de toxicité à la concentration la plus élevée utilisée (5  $\mu\text{M}$ ) (Figure 15B).

Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser le resvératrol à des concentrations allant de 0,5 à 25  $\mu\text{M}$  et ses oligomères à des concentrations allant de 0,5 à 10  $\mu\text{M}$ .

A



B

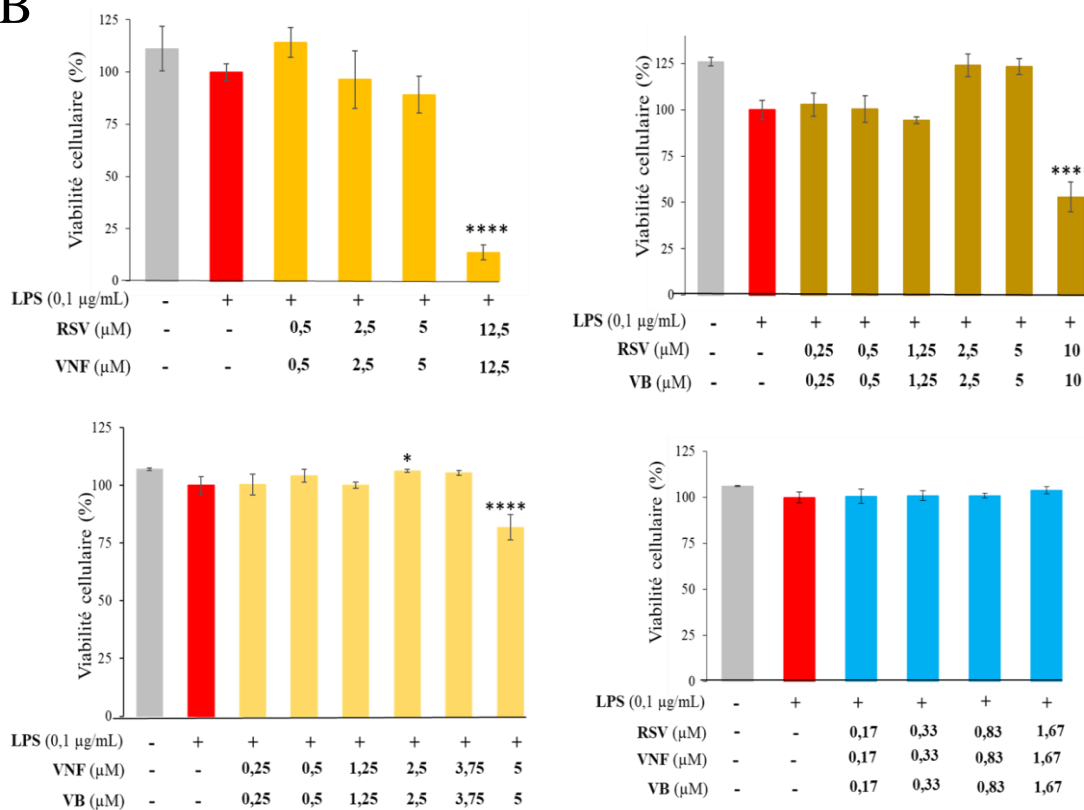


Figure 15: Viabilité des macrophages en présence du resvératrol, de l'ε-viniférine et de la vitisine B.

Les cellules sont co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS et différentes concentrations en stilbènes pendant 24H. La viabilité cellulaire a été mesurée avec le MTT. \*\*\* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001, n = 4.

### **II.3. Évaluation des effets anti-inflammatoires et antioxydants des trois stilbènes et leurs mélanges**

#### **II.3.1. Effet des stilbènes et de leurs mélanges sur la production du monoxyde d'azote**

Comme vu précédemment, le NO est un des médiateurs inflammatoires impliqués dans divers processus pathologiques liés à l'inflammation. Par conséquent, nous avons testé les effets du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B seuls, puis en associations binaires et ternaires sur la production du NO dans les macrophages activés. Les cellules ont été co-traitées avec le LPS (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) et différentes concentrations des stilbènes seuls ou en associations. Ces résultats sont présentés dans la figure 16.

Nous pouvons observer que le traitement des cellules avec le LPS induit une production du NO qui varie de 18  $\mu\text{M}$  à 28  $\mu\text{M}$  selon les expérimentations. Le co-traitement des cellules avec les stilbènes seuls ou leurs associations binaires et ternaires ont inhibé la production du NO de façon doses dépendantes (Figure 16).

Concernant les molécules individuelles, nous avons observé que le resvératrol est 2,8 et 3,2 fois moins efficace que l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B, respectivement pour l'inhibition de la production de NO. Les  $\text{IC}_{50}$  sont de 11,59  $\mu\text{M}$ , 4,15  $\mu\text{M}$  et 3,63  $\mu\text{M}$  pour le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine et de la vitisine B, respectivement (Figure 16 et tableau 9).



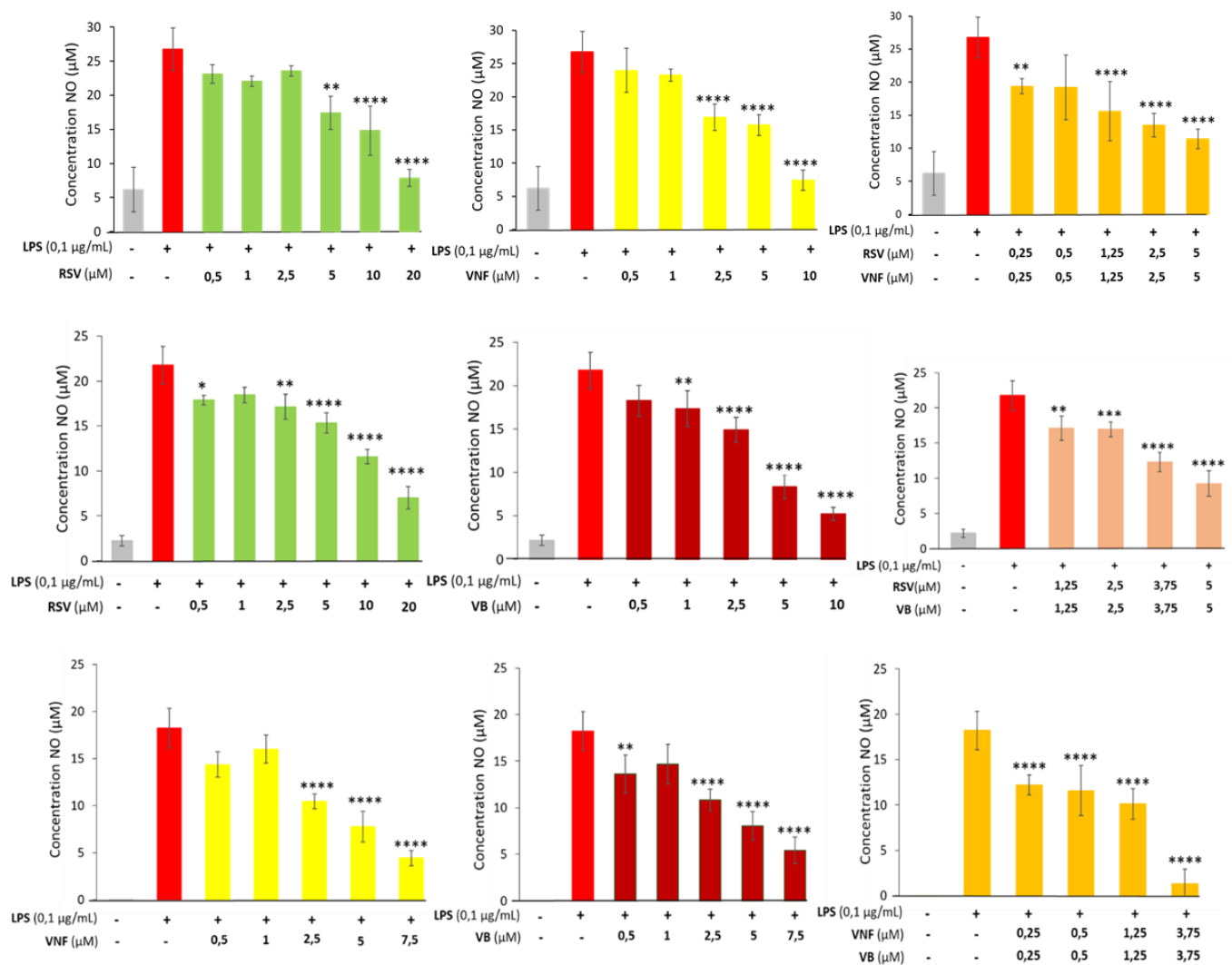


Figure 16: Effet du resvératrol, de l'ε-viniférine et la vitisine B et leurs mélanges équimolaires sur l'inhibition de la production du NO de manière dose-dépendante.

Les cellules RAW 264,7 ont été co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS pendant 24 h, puis du surnageant a été prélevé pour le dosage du NO à l'aide du réactif de Griess. \* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001, n = 4.

**Tableau 12:** Valeurs IC<sub>50</sub>, IC et DRI des combinaisons équimolaires de stilbènes lors de l'inhibition du NO

Molécules	IC <sub>50</sub> (µM)	Indice de combinaison (IC)	Indice de réduction de dose (IRD)	Interaction
Resvératrol	11,59			
ε-Viniférine	4,15			
Vitisine B	3,63			
RSV + VNF	5,41	0,78	4,2 : 1,8	Synergie
RSV + VB	3,68	0,6	6,4 : 2,2	Synergie
VNF + VB	1,23	0,38	5,3 : 5,2	Synergie
RSV + VNF + VB	5,27	0,82	ND	Synergie

Les mélanges binaires (RSV+VNF, RSV+VB, VNF+VB) et ternaires (RSV+VNF+VB) ont montré des activités anti-inflammatoires supérieures à celles des molécules individuelles (Figure 15 et tableau 9). Le mélange VNF+VB présente l'activité anti-inflammatoire la plus importante, suivi du RSV+VB, RSV+VNF puis RSV+VNF+VB (Figure 15 et tableau 9). Les indices de combinaisons (IC) des mélanges déterminés à l'aide du logiciel CompuSyn sont compris entre 0,38 et 0,78, indiquant des interactions synergiques.

Un autre paramètre peut être utilisé pour l'évaluation des interactions entre différents composés. Il s'agit de l'indice de réduction de dose (IRD) qui représente le nombre de fois que la concentration d'une molécule est réduite dans un mélange pour obtenir le même effet, voire un effet supérieur que lorsqu'elle est seule. Ce paramètre est important pour les scientifiques et les industriels car il permet de réduire la dose à utiliser d'une molécule. Plus ce paramètre est élevé, plus la dose d'une molécule est réduite. Par exemple, pour obtenir l'IC<sub>50</sub> avec le mélange RSV+VNF, il est nécessaire de réduire de 4,2 fois la concentration en resvératrol et de 1,8 fois la concentration en ε-viniférine lorsqu'ils sont utilisés seuls. Les IRD sont similaires pour le mélange RSV+VB (6,2 et 2,2 pour le resvératrol et la vitisine B, respectivement). Par contre, ils sont de 5,3 et 5,2 pour le mélange VNF+VB (Tableau 9).

### II.3.2. Effet des stilbènes et de leurs mélanges sur la production des ROS intracellulaires

Les ROS intracellulaires produits par les macrophages après stimulations par le LPS ont été mesurés à l'aide de la sonde DCFH<sub>2</sub>DA. Les cellules étaient co-traitées avec le LPS et différentes concentrations des stilbènes individuels ainsi que les combinaisons binaires du resvératrol avec ses oligomères (RSV+VNF, RSV+VB). Les résultats sont présentés dans la figure 17.

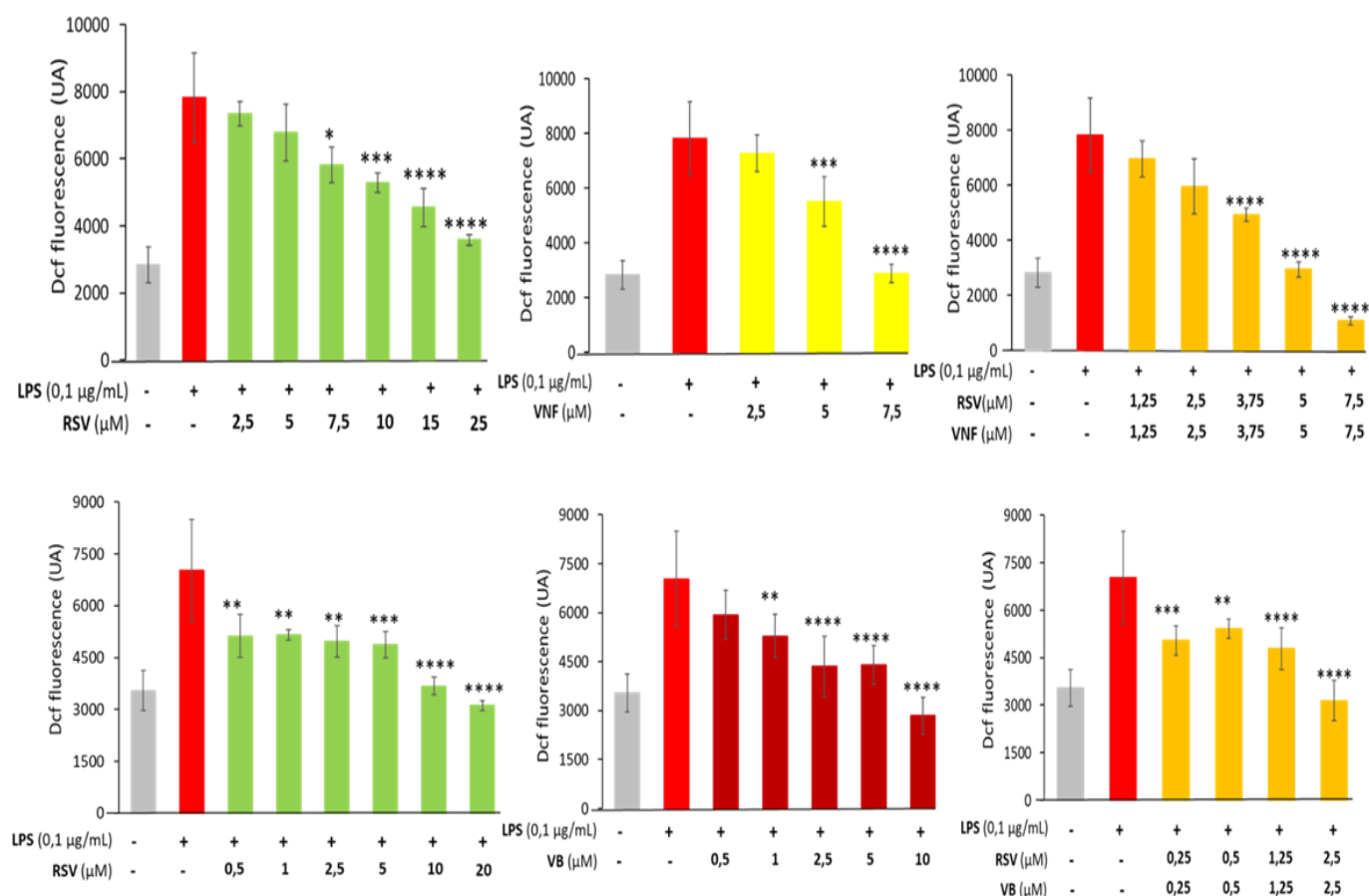


Figure 17: Effet du resvératrol, de l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B et leurs mélanges équimolaires sur l'inhibition des ROS intracellulaires de manière dose-dépendante.

Les cellules RAW 264,7 ont été co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS et différentes concentrations de stilbènes individuelles et leurs mélanges pendant 24 h. 24h après traitements, les cellules ont été incubées avec 5 µM de la sonde DCFHDA pendant 30 min. \* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 4$ .

Toutes les molécules individuelles inhibent significativement la production des ROS intracellulaires induite par le LPS de façon dose-dépendante (figures 17).

Les IC<sub>50</sub> du resvératrol, de l'ε-viniférine et de la vitisine B sont de 19,35 μM, 6,66 μM et 6,82 μM respectivement. Ainsi le resvératrol est moins efficace que ses oligomères pour l'inhibition de la production des ROS intracellulaires (figure 17 et tableau 10).

**Tableau 13:** Valeurs IC<sub>50</sub>, IC et IRD des combinaisons équimolaires de stilbènes lors de l'inhibition des ROS intracellulaires

Molécules	IC <sub>50</sub> (μM)	Indice de combinaison (IC)	Indice de réduction de dose (IRD)	Interaction
Resvératrol	19,35			
ε-Viniférine	6,66			
Vitisine B	6,82			
RSV + VNF	7,83	0,79	5,0 : 1,7	Synergie
RSV + VB	6,11	0,61	6,2 : 2,2	Synergie

Concernant les effets combinés des molécules, les deux combinaisons RSV+VNF et RSV+VB ont des effets synergiques avec des IC respectifs de 0,79 et 0,61. Si l'on prend en considération les IRD, le resvératrol associé à ses oligomères (RSV+VNF et RSV+VB), présente des IRD compris entre 5 et 6, alors que l'ε-viniférine et la vitisine B ont des IRD proches de 2 (Figure 17 et tableau 10). Ces résultats sont similaires à ceux obtenues lors du dosage du NO.

### II.3.3. Effet du resvératrol sur la production du glutathion intracellulaire

L'un des mécanismes par lequel agissent les antioxydants est l'induction de la synthèse d'antioxydants endogènes. De ce fait nous avons évalué les effets du resvératrol sur la synthèse du glutathion qui est l'antioxydant le plus important au niveau intracellulaire. Le glutathion existe sous forme réduite majoritaire (GSH) et oxydée minoritaire (GSSG). Les cellules ont été traitées avec le LPS en présence de différentes concentrations en resvératrol (1 à 15 μM). La buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la synthèse du glutathion a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats préliminaires ont montré que le resvératrol augmente la synthèse du glutathion de manière dose dépendante (Figure 18). Des expérimentations sur les effets des autres stilbènes et leurs associations sont en cours.

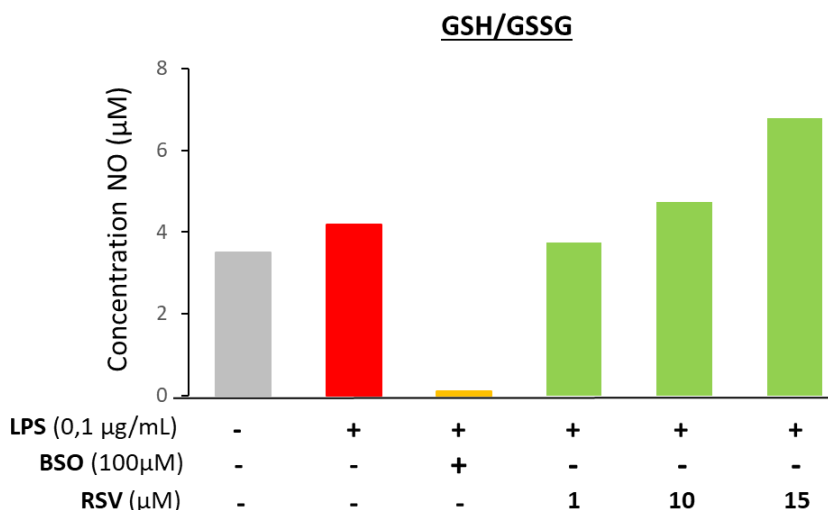


Figure 18: Effet du resvératrol sur la synthèse du glutathion.

Les cellules RAW 264,7 ont été co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS et différentes concentrations en resvératrol pendant 24 h. La mesure du glutathion a été réalisée à l'aide du test de recyclage enzymatique.

#### **II.4. Évaluation des effets anti-inflammatoires et antioxydants des métabolites du resvératrol**

Lorsque les polyphénols sont ingérés, ils subissent un métabolisme hépatique et intestinal qui module leur biodisponibilité et par la même leurs activités biologiques. Par exemple, le resvératrol est métabolisé *in vivo* en plusieurs métabolites dont essentiellement le resvératrol-3-O-sulfate, resvératrol-3-O-glucuronide et le resvératrol-4'-O-glucuronide (Patel et al. 2010, 2011). Cependant, malgré la faible biodisponibilité du resvératrol, il a été observé que celui-ci avait une activité biologique importante, ce phénomène a été appelé le « paradoxe du resvératrol » (Azorin-Ortuno et al., 2011). Ce concept a plusieurs explications : les métabolites pourraient servir de « molécules réservoirs inactives » pour la régénération du resvératrol (Maier-Salamon et al., 2013) ou alors les métabolites pourraient avoir leurs propres activités biologiques ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, les effets du resvératrol sur la santé (Eseberri et al., 2013; Hoshino et al., 2010; Lu et al., 2013; Walker et al., 2014).

### II.4.1. Effet des métabolites du resvératrol sur la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, nous avons évalué la cytotoxicité du resvératrol et de ses métabolites (resvératrol-3-O-sulfate ou R3S, du resvératrol-3-O-glucuronide ou R3G, et resvératrol-4'-O-glucuronide ou R4'G) sur la viabilité cellulaire. Les cellules RAW 264.7 ont été exposées à différentes concentrations, 5 à 20  $\mu\text{M}$  pour le resvératrol et 10 à 250  $\mu\text{M}$  pour ses métabolites, de ces composés pendant 24 h. Comme le montre la figure 19, le co-traitement des cellules avec le resvératrol ou ses métabolites n'engendrent pas de toxicité à ces concentrations nous permettant de les utiliser dans la suite de ce travail.

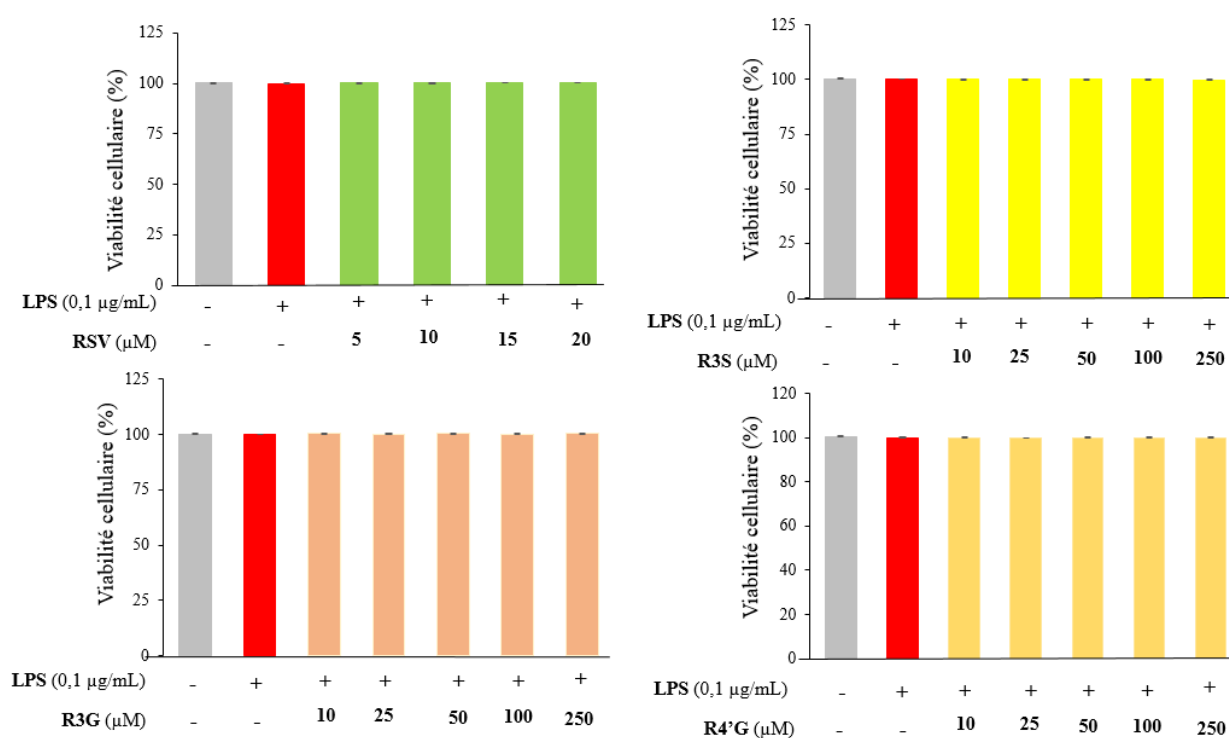


Figure 19: Viabilité des macrophages en présence du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G.

Les cellules étaient co-traitées avec 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS et différentes concentrations du RSV (5-20  $\mu\text{M}$ ) et de ses métabolites (10-250  $\mu\text{M}$ ) pendant 24H. La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du MTT. \*\*\* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \* $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

### II.4.2. Effet des métabolites du resvératrol sur la production du monoxyde d'azote

Les effets du resvératrol et ses métabolites ont été évalués sur l'inhibition de la production du NO dans les macrophages RAW 264.7 activés, et les résultats sont présentés dans la figure 20.

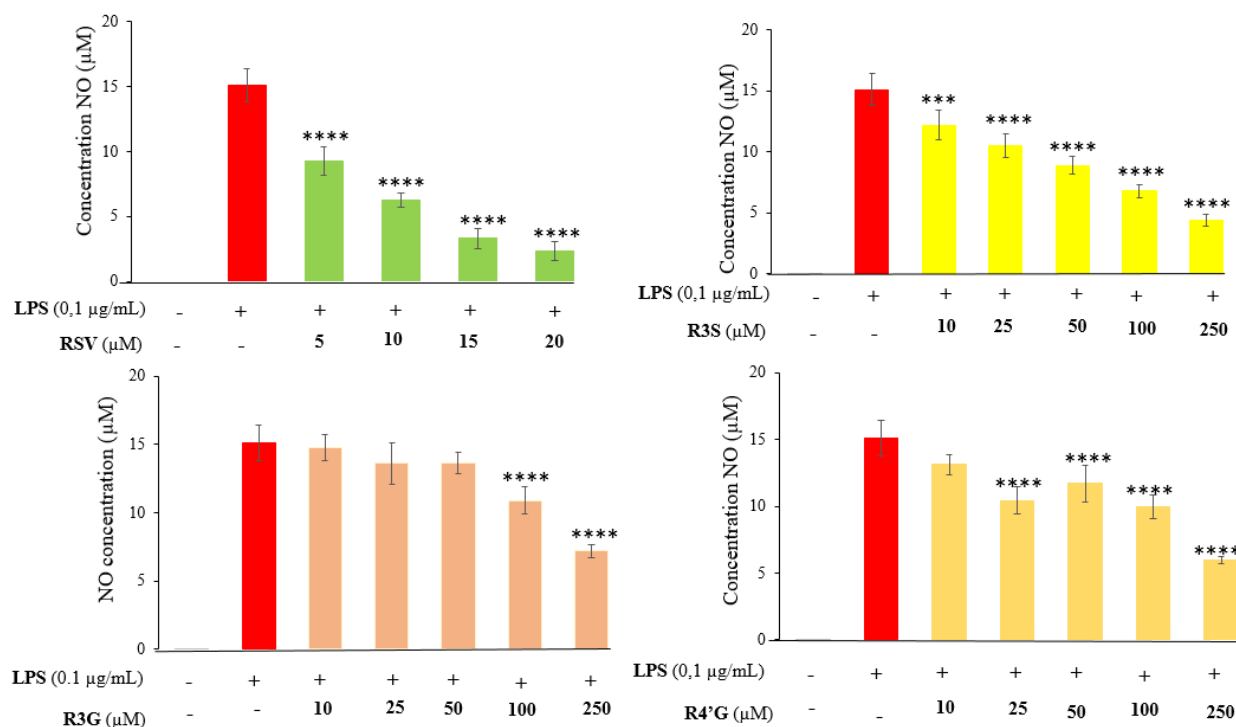


Figure 20: Effet du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G sur l'inhibition du NO de manière dose-dépendante.

Les cellules RAW 264,7 ont été co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS et différentes concentrations du RSV (5-20 µM) et de ses métabolites (10-250 µM) pendant 24 h, puis du surnageant a été prélevé pour le dosage du NO à l'aide du réactif de Griess. \*\*\* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \*\*\*\*p < 0,0001, n = 4.

Toutes les molécules inhibent la production du NO de façon dose-dépendante. Le resvératrol est plus efficace que ses métabolites pour l'inhibition de la production du NO avec une IC<sub>50</sub> de 7,8 µM. Concernant ses métabolites, le R3S est le métabolite le plus efficace, pour l'inhibition de la production du NO, avec une IC<sub>50</sub> de 81,8 µM, suivi du R4'G et du R3G avec des IC<sub>50</sub> de 190,6 µM et 236,4 µM, respectivement (Figure 20).

### II.4.3. Effet des métabolites du resvératrol sur la production des ROS intracellulaires

Les effets du resvératrol et ses métabolites ont ensuite été évalués sur l'inhibition de la production des ROS intracellulaires dans les macrophages RAW 264.7 activés (Figure 21).

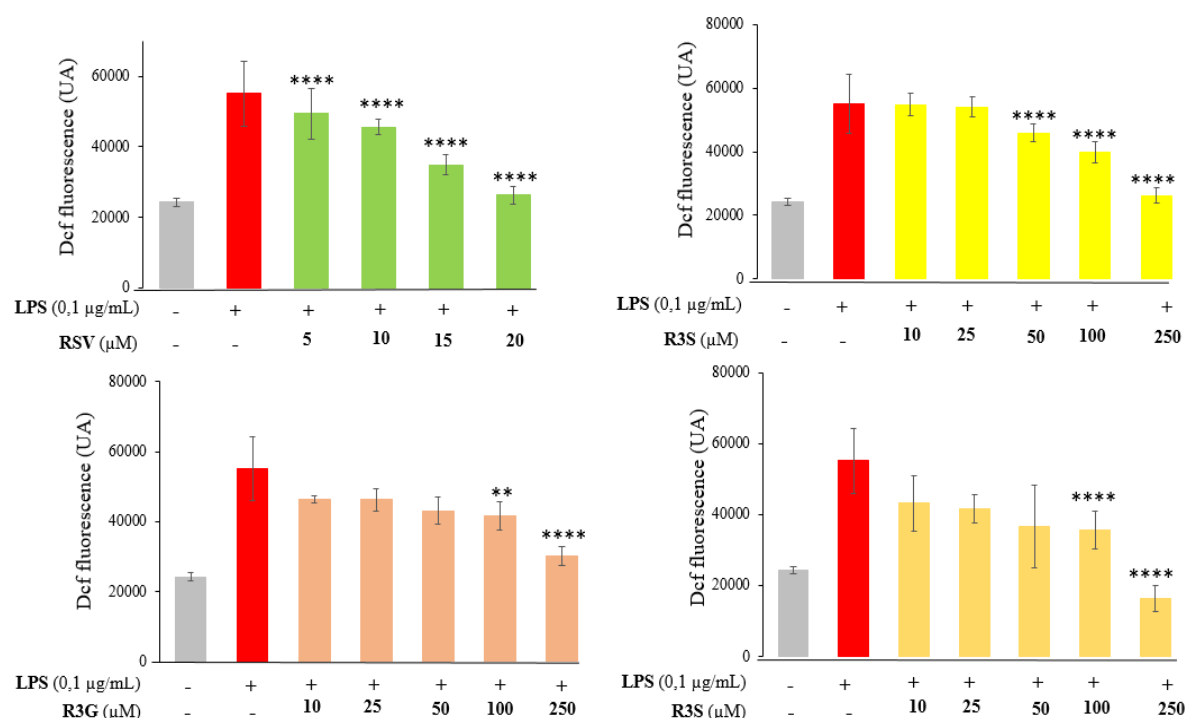


Figure 21: Effet du resvératrol, R3S, R3G et du R4'G sur l'inhibition des ROS intracellulaires de manière dose-dépendante.

Les cellules RAW 264,7 ont été co-traitées avec 0,1 µg/mL de LPS et différentes concentrations du RSV (5-20 µM) et de ses métabolites (10-250 µM) pendant 24 h. 24h après traitement, les cellules ont été incubées avec 5 µM de la sonde DCFHDA pendant 30 min. \*\*\* seuil de significativité par rapport au groupe LPS, \*\*\*\*p < 0,0001, n = 4.

Toutes les molécules inhibent significativement la production des ROS intracellulaires. Comme précédemment, le resvératrol est plus actif que ses métabolites avec une IC<sub>50</sub> de 19,2 µM. Concernant ses métabolites, le R4'G est le métabolite le plus efficace, avec une IC<sub>50</sub> de 162,8 µM, suivie du R3S avec une IC<sub>50</sub> 235,4 µM. L'IC<sub>50</sub> du R3G n'a pas été atteinte aux concentrations utilisées.



### III. Discussion du chapitre 2

Les résultats de ce chapitre ont permis d'évaluer les activités anti-inflammatoires et antioxydantes des stilbènes individuels, de leurs associations, ainsi que celles des métabolites du resvératrol dans les macrophages activés par le LPS.

La **stabilité des stilbènes** individuels a été évaluée et a montré que l' $\epsilon$ -viniférine était plus stable que le resvératrol et la vitisine B. Une étude antérieure avait rapporté que l' $\epsilon$ -viniférine avait une stabilité chimique plus élevée que celle du resvératrol (Willenberg et al., 2015). Concernant la vitisine B, sa transformation en vitisine A a été ici mise en évidence. Une des hypothèses serait que le solvant polaire (méthanol) utilisé pour les analyses en UHPLC-DAD-MS induit cette transformation. En effet, dans une revue, Keylor et al. (2015), rapportent que la vitisine B peut être convertie en vitisine A par cyclisation acide dans le méthanol (Keylor et al., 2015). Cette hypothèse reste à être vérifiée car la vitisine A augmente au court du temps dans le milieu de culture avant l'ajout de méthanol lors de la préparation des échantillons.

Nous avons ensuite évalué la **toxicité des stilbènes** sur les macrophages. Le resvératrol est la molécule la moins toxique, en comparaison de ses oligomères, ce qui est en accord avec les données de la bibliographie sur des modèles de cellules microgliales de la lignée BV-2 et sur des co-cultures primaires murines de neurones et d'astrocytes (Nassra et al., 2013; Vion et al., 2018).

**Aussi bien pour la production de NO que pour la production de ROS**, la comparaison des  $IC_{50}$  des trois stilbènes a mis en évidence que **le resvératrol présente une plus faible activité inhibitrice que son dimère et son tétramère**. De plus, les IRD calculés pour les différents mélanges, sont très proches pour ces deux dosages (RSV + VNF = 4,2 : 1,8 pour le NO versus 5,0 : 1,7 pour les ROS et RSV + VB = 6,4 : 2,2 pour le NO versus 6,2 : 2,2 pour les ROS) et les interactions sont toutes de type synergique. Les activités anti-inflammatoires et antioxydantes de ces composés étant similaires, ces résultats suggèrent une « interconnexion » entre le stress inflammatoire et le stress oxydatif dans le modèle de macrophages RAW 264.7.

Différents travaux ont mis en évidence que les oligomères de stilbènes pouvaient être plus efficace à inhiber **la production de NO**. En effet, dans son étude comparative des effets inhibiteurs des stilbènes sur les microglies, Nassra et al. (2013) ont rapporté que la vitisine B

présentait la plus forte activité inhibitrice, suivi de l' $\epsilon$ -viniférine et du resvératrol avec des  $IC_{50}$  respectivement de 4,7  $\mu M$ , 8,6  $\mu M$  et 13,1  $\mu M$ . De même, Vion et al. (2018), et Zghonda et al. (2011) ont observé que l' $\epsilon$ -viniférine avait des activités anti-inflammatoires plus élevées que le resvératrol. Les différences observées entre les activités des stilbènes pourraient s'expliquer par différentes hypothèses. Ces molécules pourraient agir sur plusieurs cibles moléculaires telles que différentes voies de signalisation, aboutissant à des effets variables. De plus, comme nous l'avons observé, et en accord avec la littérature (Fernandès et al. (2021), les stilbènes ne présentent pas tous la même stabilité dans les conditions expérimentales, pouvant faire varier leurs concentrations et donc leurs effets.

Des travaux évaluant l'activité du resvératrol sur les cellules RAW 264.7 ont montré des  $IC_{50}$  variables pour l'inhibition de la production du NO. Ces valeurs comprises entre 18,5  $\mu M$  et 46,5  $\mu M$  sont plus élevées que la valeur de notre  $IC_{50}$  (11,6  $\mu M$ ), mais restent cependant dans une gamme de concentrations assez proches (Cho et al., 2002; Djoko et al., 2007; Zong et al., 2012). De façon plus surprenante, certains auteurs n'ont pas observé d'effet inhibiteur des 2 oligomères (Chang et al., 2017) et d'autres montrent que l' $\epsilon$ -viniférine a une plus forte activité anti-inflammatoire que d'autres oligomères du resvératrol (2-r-viniférine, bétulifole A, vitisinol C,  $\alpha$ -viniférine, amurensine B, vitisinol B ainsi que la *cis*-vitisine B) (Ha et al., 2018).

Concernant les effets des mélanges, nous avons observé que toutes les associations des stilbènes ont entraîné des effets synergiques sur l'inhibition de la production du NO. Plusieurs études ont évalué les interactions entre le resvératrol et les polyphénols appartenant à d'autres classes (curcumine, ériocitrine, ECG, génistéine, épicatechine, tyrosol) sur différents modèles cellulaires (chondrocytes humaines, RAW 264.7, HCT-116, HeLa, splénocytes, EA.hy 926) (Bigagli et al., 2017; Csaki et al., 2009; J. Liu et al., 2019; Majumdar et al., 2009; Mukherjee et al., 2017; Murakami et al., 2003; Vivancos & Moreno, 2008; Zhang et al., 2022). Les auteurs ont observé que ces interactions sont généralement synergiques pour l'inhibition de la production des médiateurs inflammatoires (NO, cytokines, PGE-2, iNOS, COX-2) et pour l'inhibition des voies de signalisations (NF- $\kappa$ B, MAPK). Cependant, des interactions antagonistes ont été observées entre les associations binaires et ternaires du resvératrol avec l'EGCG et la génistéine pour l'inhibition de la production du NO dans des RAW 264.7 activées par le LPS/IFN- $\gamma$  (Murakami et al., 2003). Aucune étude sur les interactions entre l' $\epsilon$ -viniférine, la vitisine B et d'autres polyphénols n'a été réalisée à notre connaissance.

Concernant les études sur les interactions entre stilbènes, Wang et al. (2011) ont évalué les effets de l'association du resvératrol avec ses oligomères ( $\epsilon$ -viniférine, ampélopsine C, ampélopsine A, vitisine B, et vitisine A) pour l'inhibition de la production de la PGE-2. Les

auteurs ont observé que le mélange présentait une plus grande inhibition de la production de la PGE-2 par rapport aux composés individuels et ont conclu à une synergie (Wang et al., 2011). Une étude récente de Fernandès et al. (2021) a montré *in vivo* chez le rat les effets hépatoprotecteurs du mélange de resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine en ciblant les effets anti-inflammatoires et antioxydants (Fernandes et al., 2021). Les auteurs ont observé que le mélange inhibe des marqueurs pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , la COX-2, l'iNOS, et augmentait une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10. Cependant l'étude n'a pas comparé les effets du mélange avec ceux des molécules individuelles. Ainsi, notre étude a montré pour la première fois, l'existence d'interactions synergiques entre trois stilbènes de la vigne dans l'inhibition de la production du NO dans les RAW 264.7 après activation au LPS.

Concernant **la production des ROS intracellulaires**, nous avons observé qu'aussi bien les composés individuels que leurs mélanges réduisaient les ROS de façons dose-dépendante.

Concernant les effets des molécules individuelles, l'inhibition de la production des ROS intracellulaires par le resvératrol est moindre par rapport à ses oligomères. Cette observation a déjà été rapportée par Zghonda et al. (2011) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Zghonda et al., 2011).

Il existe plusieurs études qui ont évalué les activités antioxydantes pour des mélanges de resvératrol et d'autres polyphénols (génistéine, catéchine, quercétine, curcumine) sur différents modèles cellulaires (MDCK, PC12, érythrocytes humains, EAhy926) (Chu et al., 2016; Conte et al., 2003; Mikstacka et al., 2010; Zhou et al., 2021). Les auteurs ont observé que les interactions étaient soit synergiques soit additives pour l'inhibition des marqueurs oxydatifs (ROS intracellulaires, peroxydation lipidique, expression de la NADPH oxydase) et l'augmentation des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, HO-1) et du Nrf-2.

Une seule étude a évalué les effets antioxydants *in vitro* d'un mélange du resvératrol avec un autre stilbène, le ptérostilbène (Mikstacka et al., 2010). Dans cette étude effectuée dans les érythrocytes humains, les auteurs ont observé que le mélange inhibait synergiquement et additivement la peroxydation lipidique à des faibles concentrations et fortes concentrations, respectivement (Mikstacka et al., 2010).

Ainsi, notre étude montre pour la première fois les interactions antioxydantes entre le resvératrol et ses oligomères dans les macrophages RAW 264.7.

En conclusion, les résultats de la littérature indiquent, des effets anti-inflammatoires et antioxydants additifs ou synergiques pour des mélanges entre le resvératrol et d'autres

polyphénols de différentes familles, dans la majorité des cas. Nos travaux confirment que la capacité des stilbènes à réduire l'inflammation et le stress oxydatif est potentialisée quand ils sont en mélanges.

Dans la deuxième partie du chapitre, nous avons étudié **les effets biologiques des métabolites du resvératrol** sur les macrophages, dans le but d'émettre des hypothèses sur le « paradoxe du resvératrol ». En accord avec les résultats obtenus dans la littérature, le resvératrol est plus efficace que ses métabolites vis-à-vis des deux activités biologiques étudiées (Hoshino et al., 2010; Walker et al., 2014). Etant donné que les concentrations des métabolites du resvératrol observées dans la circulation sanguine peuvent être 20 fois plus élevées que celle du resvératrol (Brown et al., 2010), nous pouvons imaginer que les métabolites pourraient contribuer en partie à son efficacité pharmacologique.

D'autre part, nous avons observé que le R3S est plus actif que les métabolites glucuronidés pour inhiber la production de NO mais reste toutefois moins actif que le resvératrol. Par contre, l'étude de Hoshino a montré que le R3S inhibait l'inflammation et le stress oxydatif *in vitro* avec une efficacité similaire à celle du composé parent (Hoshino et al., 2010). Concernant l'inhibition la production des ROS intracellulaires, le R4'G présente l'activité maximale. Nos résultats suggèrent que les conjugués du resvératrol pourraient contribuer en partie à l'activité biologique de la molécule mère.

**Chapitre III : Métabolisme du resvératrol dans les macrophages**

## I. Contexte général et objectifs du chapitre III

De précédentes études réalisées au laboratoire sur l' $\epsilon$ -viniférine ont mis en évidence que les glucuronides de ce composé étaient déglucuronidés par les macrophages RAW 264.7 en culture. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce métabolisme pouvait moduler l'activité biologique des composés.

Ainsi, le principal objectif de ce chapitre était d'évaluer le devenir du resvératrol dans des macrophages en culture.

## II. Etude du métabolisme du resvératrol dans les macrophages en culture

### II.1. Métabolisme du resvératrol dans les cellules RAW264.7

#### II.1.1. Détermination des métabolites du resvératrol produits par les cellules RAW264.7

Au cours d'une des expériences menées au laboratoire sur les activités anti-inflammatoires du resvératrol dans la lignée cellulaire RAW264.7, une analyse des milieux de culture a révélé l'apparition d'un nouveau composé. Nous avons alors émis l'hypothèse d'un métabolisme du resvératrol dans ces cellules.

Ainsi, le resvératrol, à différentes concentrations (5, 10 et 25  $\mu$ M), a été incubé avec des macrophages pendant 24 heures en présence de LPS (0,1  $\mu$ g/ml). L'analyse des milieux de culture a été réalisée par UHPLC-DAD-MS (Figure 22).

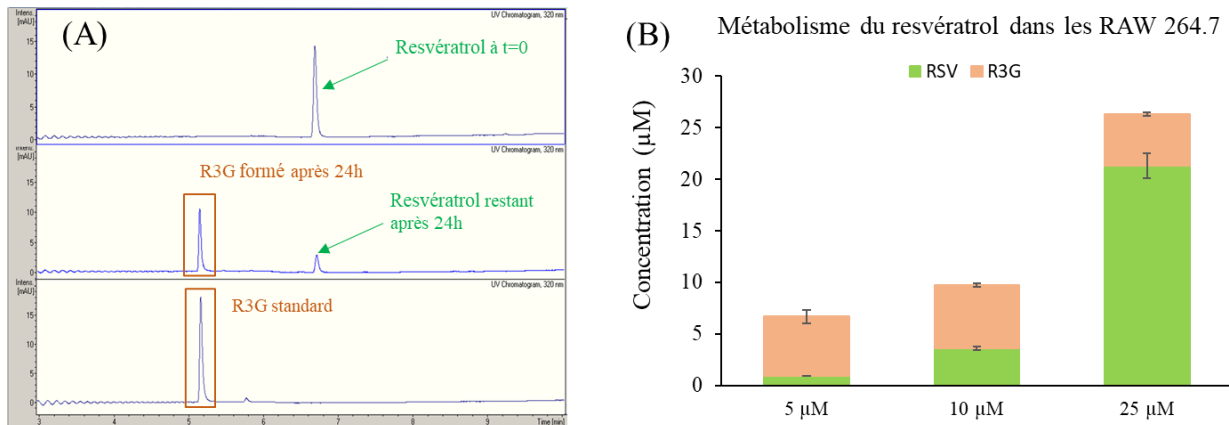


Figure 22 : Profil UHPLC-DAD et quantification du resvératrol et du resvératrol-3-O-glucuronide.

(A) Profil UHPLC-DAD du resvératrol à  $t = 0$  à un temps de rétention = 6,7 minutes, et apparition de son métabolite à un temps de rétention = 5,1 minutes après traitement des cellules RAW264.7 avec 10  $\mu\text{M}$  de resvératrol pendant 24 h. (B) La glucuronidation du resvératrol dans les milieux cellulaires RAW264.7 a été déterminée par analyse UHPLC. Les données sont des moyennes  $\pm$  SD,  $n = 4$  par condition de traitement.

Nous avons observé l'apparition d'un pic à un temps de rétention de 5,1 minutes pour les trois concentrations testées. Ce nouveau pic avait une masse sur charge ( $m/z$ ) de 404,11, ce qui correspond au  $m/z$  d'un glucuronide de resvératrol (Figure 22A). Comme rapporté dans l'état de l'art, les deux glucuronides de resvératrol identifiés dans la littérature sont R3G et R4'G. Après nous être référés aux standards de ces deux molécules, nous avons pu identifier le nouveau pic comme étant R3G. Nous avons également mis en évidence que la glucuronidation du resvératrol en R3G n'était pas proportionnelle à la concentration en resvératrol (98%, 61,5% et 20% de R3G pour 5, 10 et 25  $\mu\text{M}$  de resvératrol respectivement) (Figure 22B). Pour la suite de notre étude, nous avons choisi la concentration de 10  $\mu\text{M}$ , qui est une concentration intermédiaire pour laquelle le resvératrol n'est pas totalement métabolisé et pour laquelle le glucuronide apparaît de manière significative.

### II.1.2. Métabolisme du resvératrol par les cellules RAW264.7 en fonction du temps

Après avoir mis en évidence la glucuronidation du resvératrol dans des macrophages en culture, nous avons souhaité étudier ce métabolisme dans des conditions normales « contrôle » et inflammatoires « LPS ». Ainsi, après incubation du resvératrol à 10  $\mu\text{M}$  avec des cellules

RAW264.7 (avec ou sans LPS), la glucuronidation du resvératrol est étudiée à différents temps allant de 1h à 24h (Figure 23).

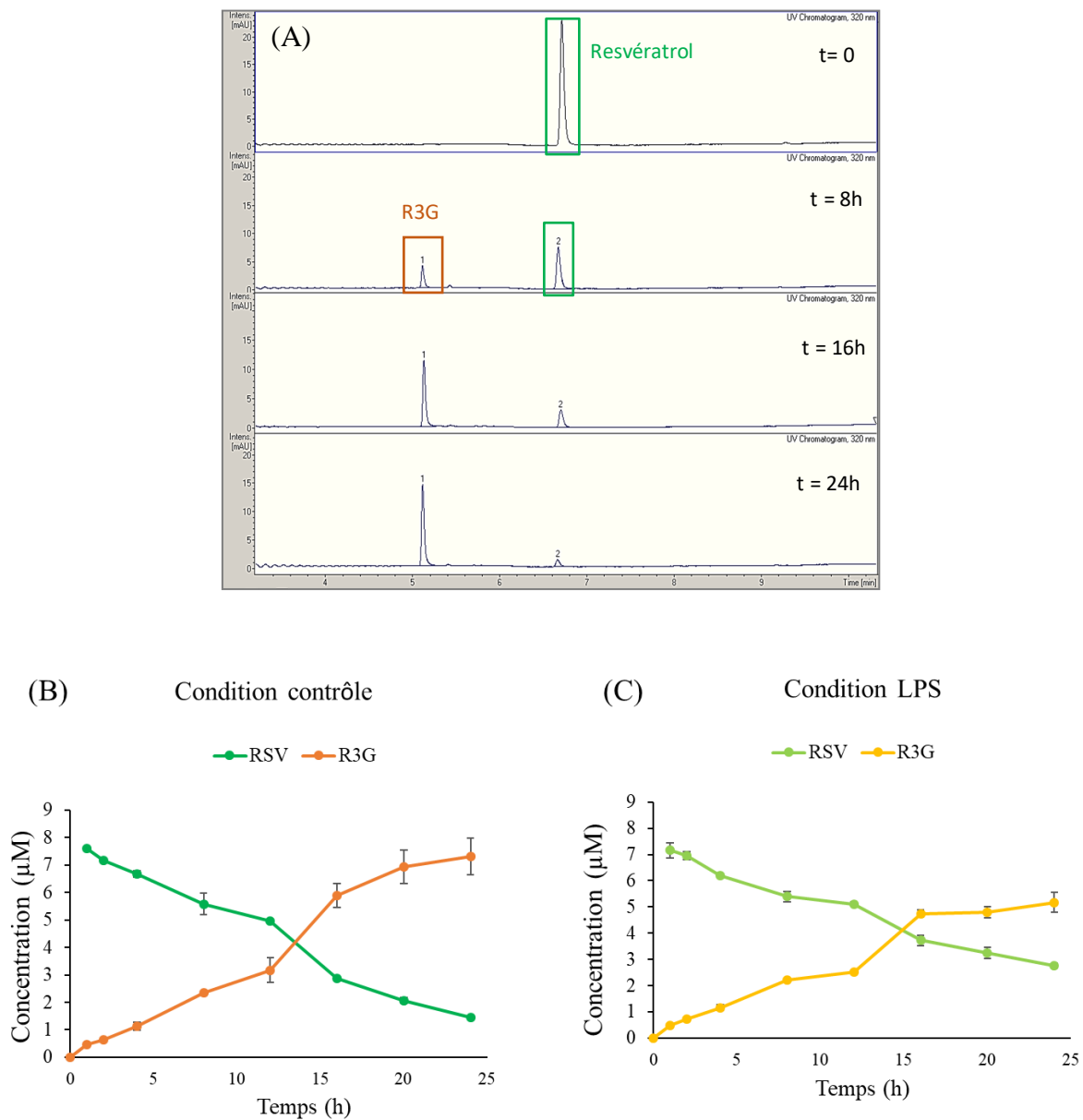


Figure 23: Profil UHPLC-DAD du resvératrol et du R3G et cinétique d'apparition du R3G.

(A) Profil UHPLC-DAD du resvératrol et de son glucuronide R3G en fonction du temps dans le milieu d'incubation RAW264.7 après traitement avec 10 µM de resvératrol. (B) Cinétique d'apparition du R3G dans le milieu cellulaire des RAW264.7 dans les conditions contrôles et (C) dans les conditions LPS. Les données sont des moyennes  $\pm$  SD, n=4 par traitement.

Dans la condition « contrôle », la concentration de resvératrol diminue progressivement en fonction du temps, atteignant 1,5 µM en 24h. Dans le même temps, la concentration de R3G augmente progressivement jusqu'à 8 µM (Figure 23A et 23B). Ces résultats suggèrent que le resvératrol peut être presque entièrement transformé en son glucuronide. Le métabolisme du



resvératrol a également été étudié dans des conditions inflammatoires « LPS ». De même que dans la condition « contrôle », la concentration en resvératrol diminue progressivement. Cependant, le resvératrol semble être moins glucuronidé (resvératrol : 2,76  $\mu\text{M}$  et R3G : 5,17  $\mu\text{M}$ ) (Figure 23C).

### Discussion

Nos résultats ont mis en évidence la production du métabolite R3G dans la lignée cellulaire de macrophages murins RAW264.7. L'identification de ce glucuronide est en accord avec la littérature car dans les modèles *in vivo* de souris et de rat, le resvératrol est presque exclusivement glucuronidé en position 3 (en R3G), alors que chez l'homme, les métabolites R3G et R4'G sont tous deux formés (Maier-Salamon et al., 2011; Springer & Moco, 2019). De plus, dans un modèle murin *in vitro*, Trepiana et al. (2020) ont démontré que le resvératrol est glucuronidé uniquement en R3G dans la lignée cellulaire hépatocytaire AML12, et aucun autre métabolite n'est détecté dans le milieu cellulaire (Trepiana et al., 2020).

Cependant, aucune étude, à notre connaissance, n'a démontré la glucuronidation du resvératrol dans les macrophages *in vitro*. En effet, la seule étude qui caractérise la glucuronidation de différents polyphénols dans les macrophages RAW264.7, n'a pas montré de glucuronidation du resvératrol alors que les auteurs ont démontré la glucuronidation de 17 polyphénols parmi les 77 composés testés (Ma et al., 2018). La différence entre nos résultats et ceux de cette dernière publication pourrait être attribuée à divers facteurs, tels que des variations dans les conditions de culture comme le nombre de cellules, les périodes d'incubation et les durées de traitement. Ma et al. (2018) ont rapporté que l'hésperidine (un flavonoïde) est glucuronidée dans les macrophages RAW264.7, et que son glucuronide est moins présent dans les cellules traitées par le LPS par rapport aux conditions « contrôle » (Ma et al., 2018).

Pour aller plus loin dans la compréhension de ces différences de métabolisme entre les conditions normales et inflammatoires, nous proposons une autre représentation des résultats avec uniquement la formation de R3G dans la condition « contrôle » et la condition « LPS » (Figure 24). Sur cette cinétique, nous pouvons mettre en évidence 2 intervalles de temps :

- le premier intervalle, entre 0 et 12h, où les 2 courbes de concentration de R3G suivent une cinétique similaire.
- le second intervalle, entre 12h et 24h, où une différence dans la concentration de glucuronide est observée, avec des concentrations plus élevées de R3G formées dans la condition « contrôle ». Cette différence devient significative pour les temps de traitement au resvératrol à 20h et 24h ( $p < 0,05$ ).

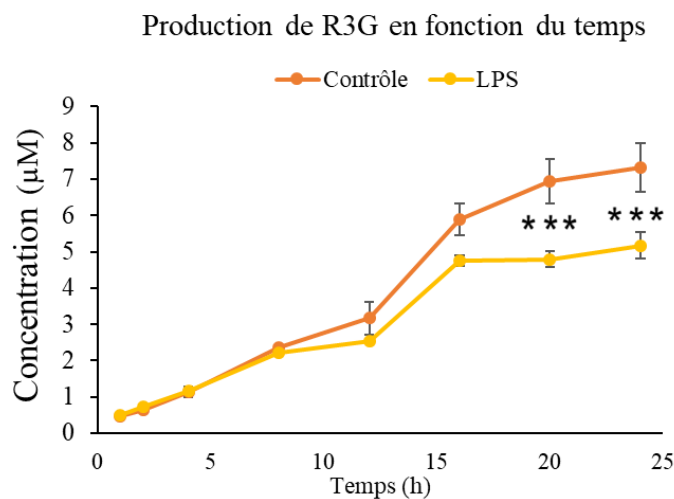


Figure 24: Cinétiques de formation de R3G, mettant en évidence la différence entre les cellules contrôles et les cellules traitées au LPS.

La différence entre les 2 conditions est statistiquement significative à 20h et 24h. Les données sont des moyennes  $\pm$  SD, n=4 par traitement. Les astérisques font référence à une différence significative  $p < 0,05$ .

Sur la base de cette observation, deux hypothèses peuvent être émises concernant la deuxième partie du graphique : soit la glucuronidation est plus faible dans les macrophages murins stimulés par le LPS, soit il y a une déconjugaison du R3G en resvératrol.

Une revue récente de 2022 décrit la déglucuronidation des polyphénols dans des conditions inflammatoires (Sheridan & Spelman, 2022). Les auteurs ont montré que peu d'études *in vitro* (27 études) et *in vivo* sur des modèles de souris, de rats ou d'humains (15 études) ont été menées sur ce sujet, malgré l'importance de ce mécanisme pour déterminer quelle forme du composé est active *in vivo*.

L'un des composés les plus étudiés est la quercétine, un flavonoïde. Il a été démontré que les glucuronides de la quercétine peuvent être retransformés en quercétine dans les macrophages stimulés par le LPS, par l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase.

## II.2. Mécanismes impliqués dans le métabolisme du resvératrol dans les macrophages

Nous avons démontré que le resvératrol peut être glucuronidé aussi bien en condition contrôle qu'en condition inflammatoire, avec une différence significative dans l'accumulation du glucuronide dans les 2 conditions. Nous émettons l'hypothèse que cette plus faible concentration en R3G est associée à une déglucuronidation du resvératrol par la  $\beta$ -glucuronidase (GUS).

Nous avons donc étudié la potentielle déglucuronidation du R3G en milieu inflammatoire. Après traitement des cellules contrôles et stimulées par le LPS avec le R3G (10  $\mu$ M), l'analyse des milieux a été réalisée à différents temps de traitement (Figure 25).

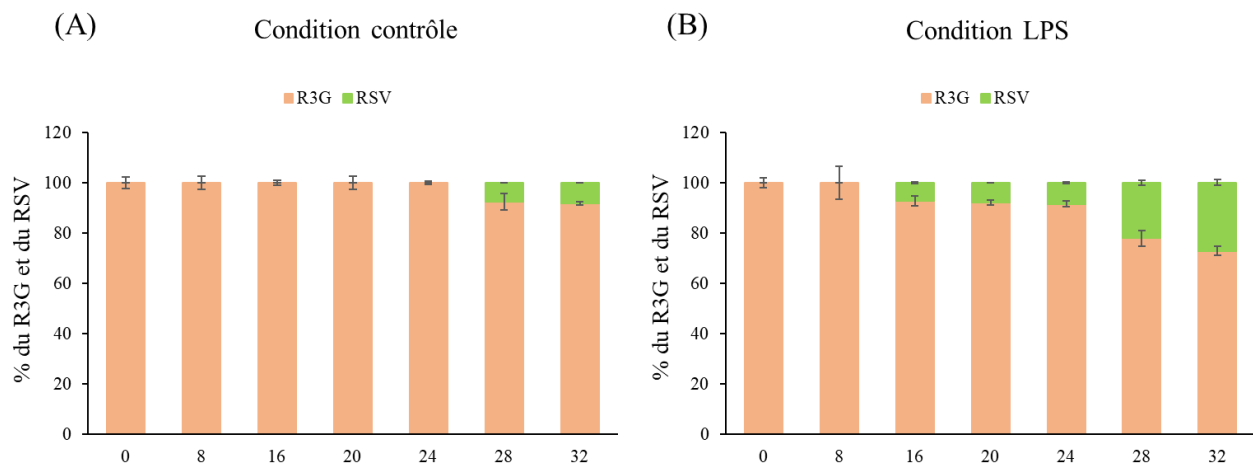


Figure 25: Déglucuronidation de R3G dans les cellules contrôle et traitées au LPS.

Le taux de déglucuronidation de R3G dans les cellules RAW 264.7 contrôle (A) et stimulées par le LPS (B) a été déterminé par analyse UHPLC-DAD du milieu cellulaire RAW264.7 à différents temps d'incubation (8-32 h). Les cellules contrôles ont été traitées avec 10  $\mu$ M de R3G et les cellules stimulées par le LPS ont été co-traitées avec 10  $\mu$ M de R3G et 0,1 mg/mL de LPS.

Dans la condition « contrôle », l'apparition de resvératrol n'est observée qu'à un faible pourcentage, uniquement après 28 et 32 heures (8 % et 8,5 %, respectivement). Cependant, dans les cellules activées par le LPS, 7,4 % du resvératrol apparaît dès 16 heures, et à 32 heures, il y a quatre fois plus de resvératrol présent.

Ainsi, tant en condition « contrôle » qu'en condition « LPS », il existe bien une déglucuronidation de R3G, ce qui nous amène à valider notre hypothèse sur la présence d'un mécanisme de déglucuronidation, certainement dû à l'activité  $\beta$ -glucuronidase. De plus, en

présence de LPS, il existe une déglucuronidation plus importante, suggérant une expression ou une activité plus élevée de la  $\beta$ -glucuronidase.

### *Discussion*

Nos données ont démontré la présence d'une déglucuronidation dans les macrophages activés par le LPS, et cette déglucuronidation pourrait être médiée par une activité ou une expression plus élevée de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase dans un environnement inflammatoire. Le rôle de la  $\beta$ -glucuronidase dans la déglucuronidation d'autres composés phénoliques a été mis en évidence. Par exemple, Ishisaka et al. en 2013, ont démontré que les macrophages RAW264.7 activés par le LPS améliorent de manière significative la déconjugaison du glucuronide de quercétine et l'accumulation de son aglycone quercétine *in vitro* (Ishisaka et al., 2013). Hayasaka et al. (2018) ont également signalé une accumulation d'aglycone de lutéoline, après traitement de RAW264.7 avec des glucuronides de lutéoline, conséquence d'une inflammation *in vitro* (Hayasaka et al., 2018).

### **II. 3. Conclusion du chapitre 3**

A notre connaissance, notre étude **représente la première mise en évidence que les macrophages métabolisent le resvératrol en son glucuronide, le R3G**. Il est intéressant de noter que ce métabolisme cellulaire du resvératrol ne présente pas de relation proportionnelle avec sa concentration, ce qui suggère des mécanismes potentiels de saturation des enzymes du métabolisme de la phase II dans les macrophages RAW264.7. Nous avons constaté que le métabolisme du resvératrol peut se produire dans des conditions normales et inflammatoires.

**La différence de métabolisme entre les conditions normales et inflammatoires** a révélé la présence d'un mécanisme de **déglucuronidation** probablement médié par l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Il serait intéressant en perspectives de mesurer, l'inhibition de la  $\beta$ -glucuronidase avec la saccharolactone, un inhibiteur spécifique. En effet, ce mécanisme a déjà été démontré pour plusieurs polyphénols, dont la quercétine, la lutéoline et la sésamine, mais jamais pour le resvératrol.

Ces résultats mettent en évidence un métabolisme des polyphénols dans des modèles de culture cellulaire. Il est important de savoir que le métabolisme d'un composé observé dans un modèle *in vitro* ne reflète pas nécessairement celui *in vivo*. **Les résultats des modèles *in vitro* ne**

**peuvent donc pas être extrapolés aux modèles *in vivo*** sans prendre en compte l'interaction entre ces composés et les enzymes du métabolisme, la microflore intestinale et les transporteurs, qui peuvent tous contribuer à la complexité du devenir d'une molécule au sein d'un organisme.

Ces résultats soulignent également l'importance du métabolisme dans la description des activités biologiques des polyphénols. En effet, nous avons montré que **ce métabolisme pouvait varier selon les conditions environnementales**. Par exemple, dans des conditions pathologiques ou dans de nombreuses maladies associées à l'inflammation, les macrophages activés pourraient métaboliser les glucuronides circulants en resvératrol. Ainsi, ce phénomène restaurerait la forme active de la molécule, ce qui lui permettrait d'exercer ses activités biologiques démontrées *in vitro*.

**DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE**

Le contrôle du stress oxydatif par l'utilisation d'antioxydants naturels, notamment issus des plantes, représente une stratégie intéressante dans la prévention de pathologies chroniques dont le stress oxydatif ou l'inflammation sont impliqués dans leur physiopathologie. Au sein d'un extrait végétal, sont présentes diverses molécules qui peuvent interagir entre elles et dont le résultat de ces interactions peut modifier les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des molécules pures. Les mesures à la fois des activités antiradicalaires dans des systèmes acellulaires et des activités antioxydantes dans des systèmes cellulaires sont les deux approches que nous avons utilisées pour caractériser le potentiel antioxydants des stilbènes seuls ou en mélanges. En effet, les polyphénols sont capables de piéger des radicaux libres en interagissant directement avec eux et en les neutralisant, et sont également capables de stimuler l'expression de systèmes enzymatiques antioxydants ou d'inhiber l'expression de systèmes enzymatiques pro-oxydant. Il s'agit donc d'une approche complémentaire permettant de caractériser les effets antioxydants dans leur globalité de ces composés.

Les résultats que nous avons obtenus lors de **la première partie de ce travail de thèse** ont mis en évidence que **les différents stilbènes, le resvératrol et ses oligomères, l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B, possèdent des activités antiradicalaires, antioxydantes et anti-inflammatoires** dans les différents modèles que nous avons utilisés.

Un résultat qui nous paraît intéressant montre que **ces activités ne semblent pas corrélées entre elles**. Par exemple, la vitisine B présente une forte activité anti-inflammatoire mais n'a pas d'activité antiradicalaire. A l'inverse, le resvératrol présente l'activité anti-inflammatoire et antioxydante la plus faible dans les tests cellulaires alors qu'il possède une activité antiradicalaire parmi les plus fortes dans les tests acellulaires.

Une première hypothèse permettant d'expliquer la différence observée au niveau des effets antiradicalaires dans les tests acellulaires serait liée à **la structure des composés**. Le resvératrol aurait une plus grande facilité à libérer ses protons afin de réduire les radicaux libres, contrairement à ses oligomères qui possèdent des structures chimiques plus complexes.

Une seconde hypothèse permettant d'expliquer ces observations serait liée à **la stabilité des composés** dans les milieux de culture cellulaire. Nos premières expériences semblent montrer

que la vitisine B ne serait pas stable dans le milieu de culture, en effet une proportion importante de cette molécule se transforme en vitisine A. Nous faisons l'hypothèse que les activités anti-inflammatoires de la vitisine B pourraient être dues, non pas à cette molécule uniquement mais également à son produit de transformation dans les milieux de culture, la vitisine A. Dans un premier temps, des expériences complémentaires visant à confirmer et caractériser la transformation de la vitisine B en vitisine A seront réalisées. Dans un second temps les activités anti-inflammatoires de la vitisine A seront mesurées et comparées à celles de la vitisine B. En corrélant l'ensemble de ces résultats (mesure de l'apparition de la vitisine A dans les milieux et culture et mesure des activités anti-inflammatoires de la vitisine A), nous devrions être capable de déterminer quelle est la part de la vitisine A dans les activités anti-inflammatoires de la vitisine B.

Une troisième hypothèse pourrait être liée à **la pénétration intracellulaire de ces composés** dans les cellules pour y exercer leurs activités biologiques. Les oligomères du resvératrol pourraient pénétrer en plus grande quantité dans les cellules par rapport au resvératrol. Des expériences complémentaires visant à mesurer les concentrations intracellulaires de ces stilbènes seront également envisagées pour répondre à cette question. Ces expériences seront réalisées dans des conditions permettant d'estimer s'il s'agit d'un transport membranaire actif ou non, et en présence d'inhibiteurs de différents systèmes de transports membranaires afin de caractériser quel transport est impliqué s'il existe. De plus, des expériences de transport dans un modèle cellulaire de barrière intestinale (modèle cellulaire Caco-2) nous permettront de déterminer si ces composés sont capables de franchir une barrière cellulaire.

Enfin, une dernière hypothèse serait liée à **une biotransformation de ces composés** lorsqu'ils sont en contact avec les macrophages en composés plus ou moins biologiquement actifs. En effet, nos résultats ont mis en évidence d'une part un métabolisme du resvératrol en son glucuronide dans les macrophages qu'ils soient activés ou non par le LPS. Nous n'avons cependant pas identifié de relation proportionnelle entre l'apparition du glucuronide du resvératrol et la concentration de ce dernier. Ce résultat suggère des mécanismes potentiels de saturation des enzymes du métabolisme de la phase II dans les macrophages RAW264.7. D'autre part, nous avons également observé à la suite de cette glucuronidation du resvératrol, sa déglucuronidation redonnant la forme native du resvératrol. Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude mettant en évidence ce phénomène de conjugaison et déconjugaison dans les macrophages.



Une perspective de ce travail serait de caractériser l'impact du métabolisme dans les activités anti-inflammatoires des stilbènes en utilisant des inhibiteurs des enzymes mise en jeu dans ce métabolisme (UDP-glucuronosyl transférase et glucuronidase).

En parallèle, nous avons observé des effets anti-inflammatoires des glucuronides mais pour des concentrations bien supérieures à celles de la molécule mère. Les glucuronides du resvératrol ont donc des propriétés anti-inflammatoires mais plus faibles que celles du resvératrol.

L'ensemble de ces observations nous permet de conclure que la présence du métabolisme joue un rôle important dans les effets biologiques de la molécule. En effet, nos données démontrent que le resvératrol est la forme active responsable des effets inhibiteurs observés *in vitro*, alors que le R3G n'a pas ou peu d'impact sur la production de NO et de ROS. Si le mécanisme de déglucuronidation intervenait *in vivo*, il participerait à la restauration de la forme active de la molécule, lui permettant d'exercer ses activités biologiques.

Nous n'avons pas mis en évidence le métabolisme de l' $\epsilon$ -viniférine ou de la vitisine B dans les macrophages (résultat non montré). Etant donné que les métabolites semblent moins actifs que les molécules mères, ces deux stilbènes n'étant pas métabolisés dans les macrophages, ils conservent leur pleine efficacité. Ces observations paraissent donc cohérentes avec une activité anti-inflammatoire des stilbènes qui doit tenir compte de leur métabolisme.

**La deuxième partie de ce travail de thèse concernait les interactions des stilbènes sur leurs activités anti-inflammatoires, anti-oxydantes et antiradicalaires.**

**Concernant les activités antiradicalaires**, nous avons montré, en fonction des combinaisons testées et des tests utilisés, principalement des effets additifs et synergiques. Par exemple, toutes les combinaisons binaires ont entraîné des interactions additives antiradicalaires dans les tests du piégeage du radical DPPH et du NO. Par contre, toujours concernant les activités antiradicalaires, les combinaisons binaires ont montré des interactions additives, synergiques ou antagonistes en fonction du mélange dans le test FRAP.

Dans la littérature, quelques hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes impliqués dans les interactions des stilbènes. Une interaction additive pourrait s'expliquer par la somme des activités individuelles. Une interaction synergique ou antagoniste pourrait s'expliquer par un mécanisme de régénération. Lors d'une interaction synergique, le stilbène

ayant le potentiel réducteur le plus faible n'agirait pas directement sur l'espèce radicalaire mais indirectement en régénérant le stilbène ayant le pouvoir réducteur le plus fort qui à son tour prendrait en charge l'espèce radicalaire. Lors d'une interaction antagoniste, il se produirait l'inverse.

Notre travail constitue **la première étude sur les effets anti-inflammatoires de mélanges d'oligomères de stilbènes**. Contrairement aux résultats de la littérature qui indiquent que des polyphénols de familles différentes exercent des interactions additives, synergiques ou antagonistes, nous avons montré que tous les mélanges testés, qu'ils soient binaires ou ternaires, produisent des interactions de nature synergique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes de ces interactions.

Une première hypothèse envisage **la formation d'un nouveau composé** formé par des interactions chimiques entre les composés présents. Cette première hypothèse nous semble peu probable dans notre cas. En effet chaque mélange a été analysé par UHPLC-DAD-MS avant son utilisation, et nous n'avons jamais observé l'apparition de nouveaux composés mais bien la présence des trois composés individuels.

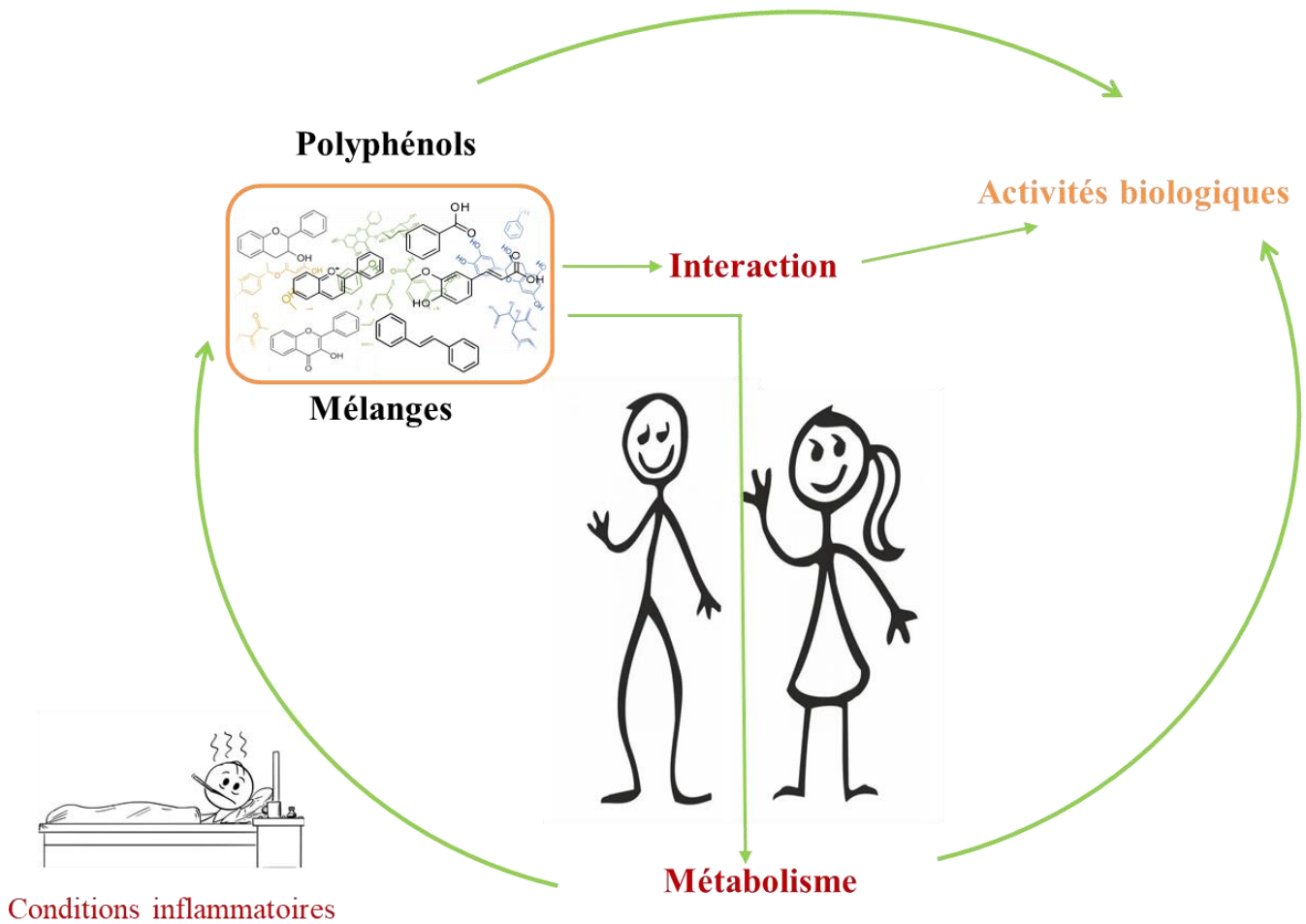
Une seconde hypothèse qui nous paraît plus probable serait que ces composés **agiraient soit sur les mêmes voies de signalisation, soit sur des voies de signalisations distinctes** mais qui aboutiraient toutes à l'inhibition de marqueurs pro-oxydants ou pro-inflammatoires. Dans ce cadre, il pourrait être envisagé de poursuivre et de préciser l'étude de ces interactions en se focalisant d'une part sur d'autres médiateurs de l'inflammation comme des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  pour les cytokines pro-inflammatoires et IL-10 comme principale cytokine anti-inflammatoire) ainsi que sur les voies de signalisation qui les régulent. Le stress oxydant et la réponse inflammatoire présentant des voies de signalisation distincte mais interconnectées, il est tout à fait envisageable que certains stilbènes au sein d'un mélange agissent sur l'une et/ou l'autre de ces voies. En modifiant le potentiel redox intracellulaire, les effets de ces mélanges pourraient donc tout à fait avoir des répercussions sur la réponse inflammatoire, et vice versa.

**L'utilisation d'extraits contenant des combinaisons de molécules naturelles** présentent de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de molécules seules. Une molécule peut être utilisée dans un mélange pour moduler l'effet d'une autre molécule, en augmentant ou diminuant son effet. Les mélanges de molécules pourraient permettre de cibler différentes voies de signalisation afin de potentialiser un effet. Ils pourraient également permettre d'utiliser

diverses molécules à faibles concentrations tout en obtenant le même effet, ce qui peut limiter la toxicité des composés individuels. Dans notre cas, les effets des mélanges de stilbènes que nous avons utilisés sont similaires à ceux observés pour un extrait de sarment de vignes enrichi en stilbène ce qui représente une opportunité de valorisation de ces co-produits de la vigne.

**En conclusion**, les résultats obtenus lors de ce travail de thèse montrent pour la première fois une modification du métabolisme du resvératrol par des macrophages activés. Ainsi l'environnement inflammatoire présents dans certaines pathologies peut modifier les proportions de métabolites et de molécules mères, et ainsi, moduler l'activité biologique. Nous avons également montré pour la première fois l'existence d'interactions antiradicalaires dans des systèmes acellulaires, antioxydantes et anti-inflamatoires dans des systèmes cellulaires entre le resvératrol, et deux de ses oligomères, l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B. La plupart des résultats obtenus indiquent des interactions additives ou synergiques, quels que soient les modèles ou les tests utilisés, montrant ainsi des phénomènes de coopération entre les composés de cette même famille. Cette approche et ce domaine de recherche autour de l'activité de mélange de molécules naturelles ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement de compléments alimentaires ou pourquoi pas de médicaments pour la prévention de la survenue ou de la progression de pathologies chroniques dont la physiopathologie découle d'un stress oxydant ou inflammatoire.

## Schéma récapitulatif de la thèse



## ***Communications scientifiques***

### **Publications dans des journaux à comité de lecture**

1. **Biranty Sy**, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, Arnaud Courtois. Resveratrol,  $\epsilon$ -Viniferin, and Vitisin B from Vine: Comparison of Their *In Vitro* Antioxidant Activities and Study of Their Interactions. *Molecules* 2023, 28, 7521. <https://doi.org/10.3390/molecules28227521>
2. **Biranty Sy**, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, Arnaud Courtois. Polyphenols in food: A comprehensive review of their interactions in anti-inflammatory and antioxidant activities (en préparation).

### **Communication orale**

1. **Biranty SY**, Stéphanie Krisa, Tristan Richard, Claude Atgié, Arnaud Courtois. « Stilbenes from *Vitis vinifera* L. wood: study about their stability, interactions, and metabolism related to their biological properties ». Symposium: 19th French-Spanish meeting CTPIOD, 17 Octobre 2022, Saragosse (Espagne).
2. **Biranty SY**, Arnaud Courtois. « Les polyphénols de la vigne et du vin : études de leurs interactions et de leur métabolisme dans l'intérêt pour la santé humaine ». HappyHour de la recherche, 2<sup>e</sup> édition, 16 mars 2023, Bordeaux (France)
3. **Biranty SY**, Stéphanie Krisa, Arnaud Courtois. « Interactions des stilbènes de la vigne dans l'implication de leurs effets antiradicalaires et anti-inflammatoires ». Symposium : 14<sup>e</sup> journée MétaSP, 05 Mai 2023, Reims (France)
4. **Biranty SY**, Stéphanie Krisa, Arnaud Courtois. « Interactions between grapevine stilbenes and their antioxidant and anti-inflammatory activities ». Symposium: 20th French-Spanish meeting CTPIOD, 16 Octobre 2023, Bordeaux (France).
5. **Biranty SY**, Stéphanie Krisa, Arnaud Courtois. « Metabolism of resveratrol in macrophages RAW 264.7 ». Virtual Euskampus\_Workshop, 09 Novembre 2023.

### **Communication par affiches**

1. **Biranty Sy**, Stéphanie Krisa, Pauline Beaumont, Nour Attar, Tristan Richard, Arnaud Courtois. « Interaction of stilbenes from *Vitis vinifera* for their antiradical, antioxidant and anti-inflammatory properties ». XXXI International Conference on Polyphenols, 3rd to 6th July 2023, Nantes (France).

## REFERENCES

- Abbasi-Parizad, P., De Nisi, P., Pepè Sciarria, T., Scarafoni, A., Squillace, P., Adani, F., & Scaglia, B. (2022). Polyphenol bioactivity evolution during the spontaneous fermentation of vegetal by-products. *Food Chemistry*, 374, 131791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131791>
- Aftab, N., Likhitwitayawuid, K., & Vieira, A. (2010). Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Natural Product Research*, 24(18), 1726-1733. <https://doi.org/10.1080/14786410902990797>
- Aja-Perez, I., Krisa, S., Hornedo-Ortega, R., Ruiz, M. B., Ruiz-Sanz, J. I., Richard, T., & Courtois, A. (2021). *Stilbenes at Low Micromolar Concentrations Mitigate the NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and ROS Production in LPS-S*.
- Al-Khayri, J. M., Mascarenhas, R., Harish, H. M., Gowda, Y., Lakshmaiah, V. V., Nagella, P., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A.-S. (2023). *Stilbenes, a Versatile Class of Natural Metabolites for Inflammation—An Overview*.
- Andres-Lacueva, C., Macarulla, M. T., Rotches-Ribalta, M., & Urpi-Sarda, M. (2012). Distribution of Resveratrol Metabolites in Liver, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle in Rats Fed Different Doses of This Polyphenol. *J. Agric. Food Chem.*
- An-Na Li, Sha Li, Yu-Jie Zhang, Xiang-Rong Xu, Yu-Ming Chen, & Hua-Bin Li. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6((12)), 6020-6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Asghari, S., Rafrat, M., Farzin, L., Asghari-Jafarabadi, M., Ghavami, S.-M., & Somi, M.-H. (2018). Effects of Pharmacologic Dose of Resveratrol Supplementation on Oxidative/Antioxidative Status Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients : A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(2), 307-317. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.036>
- Ates, O., Cayli, S., Altinoz, E., Gurses, I., Yucel, N., Kocak, A., Yologlu, S., & Turkoz, Y. (2006). Effects of resveratrol and methylprednisolone on biochemical, neurobehavioral and histopathological recovery after experimental spinal cord injury. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(10), 1317-1325. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00416.x>
- Aumont, V., Krisa, S., Battaglia, E., Netter, P., Richard, T., Mérillon, J.-M., Magdalou, J., & Sabolovic, N. (2001). Regioselective and Stereospecific Glucuronidation of trans- and cis-Resveratrol in Human. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 281-289. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2496>
- Austin, M. B., & Noel, J. P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 20(1), 79-110. <https://doi.org/10.1039/b100917f>

- Azorin-Ortuno, M., Yanez-Gascon, M. J., Vallejo, F., Pallares, F. J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J. C., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Conesa, M. T., & Espin, J. C. (2011). Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Mol. Nutr. Food Res.*
- Beaumont, P., Courtois, A., Atgié, C., Richard, T., & Krisa, S. (2022). In the shadow of resveratrol : Biological activities of epsilon-viniferin. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 78(2), 465-484. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00880-x>
- Beaumont, P., Faure, C., Courtois, A., Jourdes, M., Marchal, A., Teissedre, P.-L., Richard, T., & Atgi, C. (2021). *Trans-ε-Viniferin Encapsulation in Multi-Lamellar Liposomes : Consequences on Pharmacokinetic Parameters, Biodistribution and Glucuronide Formation in Rats.*
- Benavente-García, O., & Castillo, J. (2008). Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids : New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205. <https://doi.org/10.1021/jf8006568>
- Benbougerra, N., Hornedo-Ortega, R., Garcia, F., El Khawand, T., Saucier, C., & Richard, T. (2021). Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 362-381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.060>
- Benbougerra, N., Valls-Fonayet, J., Krisa, S., Garcia, F., Saucier, C., Richard, T., & Hornedo-Ortega, R. (2021). Polyphenolic Characterization of Merlot, Tannat and Syrah Skin Extracts at Different Degrees of Maturity and Anti-Inflammatory Potential in RAW 264.7 Cells. *Foods*, 10(3), 541. <https://doi.org/10.3390/foods10030541>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power” : The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernal-Mercado, A., Vazquez-Armenta, F., Tapia-Rodriguez, M., Islas-Osuna, M., Mata-Haro, V., Gonzalez-Aguilar, G., Lopez-Zavala, A., & Ayala-Zavala, J. (2018). Comparison of Single and Combined Use of Catechin, Protocatechuic, and Vanillic Acids as Antioxidant and Antibacterial Agents against Uropathogenic Escherichia Coli at Planktonic and Biofilm Levels. *Molecules*, 23(11), 2813. <https://doi.org/10.3390/molecules23112813>
- Bertelli, A. A., Giovannini, L., Stradi, R., Urien, S., Tillement, J. P., & Bertelli, A. (1996). Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, 16(4-5), 77-81.
- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.-M., & Richard, T. (2017). Antioxidant and Cytoprotective Activities of Grapevine Stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24), 4952-4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
- Bigagli, E., Cinci, L., Paccosi, S., Parenti, A., D'Ambrosio, M., & Luceri, C. (2017). Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-

- stimulated RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*, *43*, 147-155.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.012>
- Bijnsdorp, I. V., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2011). Analysis of Drug Interactions. In I. A. Cree (Éd.), *Cancer Cell Culture* (Vol. 731, p. 421-434). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_34)
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, *181*(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Böhmdorfer, M., Szakmary, A., Schiestl, R. H., Vaquero, J., Riha, J., Brenner, S., Thalhammer, T., Szekeres, T., & Jäger, W. (2017). *Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases in the Excretion and Tissue Distribution of Resveratrol in Mice*.
- Boocock, D. J., Patel, K. R., Faust, G. E. S., Normolle, D. P., Crowell, J. A., Brenner, D. E., Booth, T. D., Gescher, A., & Steward, W. P. (2008). *Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography*.
- Boue, S. M., Shih, B. Y., Burow, M. E., Eggleston, G., Lingle, S., Pan, Y.-B., Daigle, K., & Bhatnagar, D. (2013). Postharvest Accumulation of Resveratrol and Piceatannol in Sugarcane with Enhanced Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(35), 8412-8419. <https://doi.org/10.1021/jf4020087>
- Bralley, E. E., Greenspan, P., Hargrove, J. L., Wicker, L., & Hartle, D. K. (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *Journal of Inflammation*.
- Bravo, L. (s. d.). Polyphenols : Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11).
- Bravo, L. (1998). Polyphenols : Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, *56*(11), 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., Vasilinin, G., Sen, A., Schinas, A. M., Piccirilli, G., Brown, K., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Brenner, D. E. (2010). Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers : Safety, Pharmacokinetics, and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. *Cancer Research*, *70*(22), 9003-9011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2364>
- Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., & Collin, S. (2005). Hop as an Interesting Source of Resveratrol for Brewers : Optimization of the Extraction and Quantitative Study by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(2), 424-429.  
<https://doi.org/10.1021/jf040179n>



- Castro-Barquero, S., Lamuela-Raventós, R., Doménech, M., & Estruch, R. (2018). Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*, *10*(10), 1523. <https://doi.org/10.3390/nu10101523>
- Chang, C.-I., Chien, W.-C., Huang, K.-X., & Hsu, J.-L. (2017). *Anti-Inflammatory Effects of Vitisinol A and Four Other Oligostilbenes from Ampelopsis brevipedunculata var. Hancei*.
- Chaplin, A., & Carp, C. (2018). *Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota*.
- Chen, S., Zhao, X., Ran, L., Wan, J., Wang, X., Qin, Y., Shu, F., Gao, Y., Yuan, L., Zhang, Q., & Mi, M. (2015). Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease : A randomized controlled trial. *Digestive and Liver Disease*, *47*(3), 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.11.015>
- Chen, Y., Wei, X., Xie, H., & Deng, H. (2008). Antioxidant 2-Phenylbenzofurans and a Coumestan from *Lespedeza virgata*. *Journal of Natural Products*, *71*(6), 929-932. <https://doi.org/10.1021/np800016e>
- Chiva-Blanch, G., & Badimon, L. (2017). Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome : Current Evidences from Human Trials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2017/5812401>
- Cho, D.-I., Koo, N.-Y., Chung, W. J., Kim, T.-S., Ryu, S. Y., Im, S. Y., & Kim, K.-M. (2002). Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells : Structural requirements and mechanism of action. *Life Sciences*, *71*(17), 2071-2082. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01971-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01971-9)
- Chu, C., Lu, F.-J., Yeh, R.-H., Li, Z.-L., & Chen, C.-H. (2016). Synergistic antioxidant activity of resveratrol with genistein in high-glucose treated Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biomedical Reports*, *4*(3), 349-354. <https://doi.org/10.3892/br.2016.573>
- Cione, E., Torre, C. L., Cannataro, R., Caroleo, M. C., Plastina, P., & Gallelli, L. (2020). *Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol : From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation*.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(3), 362-372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D)
- Colombo, F., Lorenzo, C. D., Regazzoni, L., Fumagalli, M., & Sangiovanni, E. (2019). *Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (Vitis vinifera L.) varieties*.
- Conte, A., Pellegrini, S., & Tagliazucchi, D. (2003). Synergistic protection of PC12 cells from  $\beta$ -amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin*, *62*(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.08.001>
- Corrêa, M. F. P., Ventura, T. L. B., Muzitano, M. F., Dos Anjos Da Cruz, E., Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Rossi-Bergmann, B., & Soares Costa, S. (2018). Suppressive effects of Vochysia divergens aqueous leaf extract and its 5-methoxyflavone on murine macrophages and

- lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 221, 77-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.007>
- Courtois, A., Atgi, C., & Lap, C. (2018). *Tissular Distribution and Metabolism of trans-ε-Viniferin after Intraperitoneal Injection in Rat*.
- Courtois, A., Jourdes, M., Dupin, A., Lap, C., Renouf, E., Biais, B., Teissedre, P.-L., & Richard, T. (2017). *In Vitro Glucuronidation and Sulfation of ε-Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats*.
- Csaki, C., Mobasheri, A., & Shakibaei, M. (2009). Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes : Inhibition of IL-1β-induced NF-κB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & Therapy*, 11(6), R165.  
<https://doi.org/10.1186/ar2850>
- De Marino, S., Gala, F., Borbone, N., Zollo, F., Vitalini, S., Visioli, F., & Iorizzi, M. (2007). Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry*, 68(13), 1805-1812. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.03.029>
- Deng, N., Liu, C., Chang, E., Ji, J., Yao, X., Yue, J., Bartish, I. V., Chen, L., Jiang, Z., & Shi, S. (2017). High temperature and UV-C treatments affect stilbenoid accumulation and related gene expression levels in *Gnetum parvifolium*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.001>
- Dilshara, M. G., Lee, K.-T., Kim, H. J., Lee, H.-J., Choi, Y. H., Lee, C.-M., Kim, L. K., & Kim, G.-Y. (2014). Anti-inflammatory mechanism of α-viniferin regulates lipopolysaccharide-induced release of proinflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Cellular Immunology*, 290(1), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.009>
- Djoko, B., Chiou, R. Y.-Y., Shee, J.-J., & Liu, Y.-W. (2007). Characterization of Immunological Activities of Peanut Stilbenoids, Arachidin-1, Piceatannol, and Resveratrol on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation of RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2376-2383. <https://doi.org/10.1021/jf062741a>
- Duarte, N., Ramalheite, C., Rijo, P., Reis, M. A., & Ferreira, M.-J. U. (2020). Stilbenoids in Grapes and Wine. In J. Xiao, S. D. Sarker, & Y. Asakawa (Éds.), *Handbook of Dietary Phytochemicals* (p. 1-28). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1745-3\\_21-1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1745-3_21-1)
- Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246(4), 597-623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>
- Durak, A., Gawlik-Dziki, U., & Pecio, Ł. (2014). Coffee with cinnamon – Impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory in vitro activity. *Food Chemistry*.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols : A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 2221-2243.

- Dvorakova, M., & Landa, P. (2017). Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids : A review. *Pharmacological Research*, 124, 126-145. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.002>
- Ehala, S., Vaher, M., & Kaljurand, M. (2005). Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6484-6490. <https://doi.org/10.1021/jf050397w>
- El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T., & Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes : Sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1007-1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>
- Eom, S. J., Hwang, J. E., Kim, K.-T., & Paik, H.-D. (2018). Increased antioxidative and nitric oxide scavenging activity of ginseng marc fermented by *Pediococcus acidilactici* KCCM11614P. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 185-191. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0207-y>
- Esatbeyoglu, T., Ewald, P., Yasui, Y., Yokokawa, H., Wagner, A. E., Matsugo, S., Winterhalter, P., & Rimbach, G. (2016). Chemical Characterization, Free Radical Scavenging, and Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of a Stilbenoid-Rich Root Extract of *Vitis vinifera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/8591286>
- Eseberri, I., Lasa, A., Churrua, I., & Portillo, M. P. (2013). Resveratrol Metabolites Modify Adipokine Expression and Secretion in 3T3-L1 Pre-Adipocytes and Mature Adipocytes. *PLoS ONE*, 8(5), e63918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063918>
- Fernandes, J. C., Schemitt, E. G., Da Silva, J., Marroni, N. P., Lima, A., & Ferreira, R. B. (2021). Combination of Trans-Resveratrol and  $\epsilon$ -Viniferin Induces a Hepatoprotective Effect in Rats with Severe Acute Liver Failure via Reduction of Oxidative Stress and MMP-9 Expression. *Nutrients*, 13(11), 3677. <https://doi.org/10.3390/nu13113677>
- Fernández-Marín, M. I., Guerrero, R. F., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., Ramírez, P., & Cantos-Villar, E. (2013). Terroir and variety : Two key factors for obtaining stilbene-enriched grapes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.009>
- Foster, B. C., Arnason, J. T., & Briggs, C. J. (2004). *NATURAL HEALTH PRODUCTS AND DRUG DISPOSITION\**.
- Francis, M. A., & Rew, W. V. (2010). Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2479-2487. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.262>
- Frank, M. J., Johnson, J. B., & Rubin, S. H. (1976). Spectrophotometric Determination of Sodium Nitroprusside and its Photodegradation Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(1), 44-48. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650107>

- Gabaston, J., Cantos-Villar, E., Biais, B., Waffo-Teguo, P., Renouf, E., Corio-Costet, M.-F., Richard, T., & Mérillon, J.-M. (2017). Stilbenes from *Vitis vinifera* L. Waste : A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara Viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2711-2718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00241>
- Gabaston, J., Valls Fonayet, J., Franc, C., Waffo-Teguo, P., De Revel, G., Hilbert, G., Gomès, E., Richard, T., & Mérillon, J.-M. (2020). Characterization of Stilbene Composition in Grape Berries from Wild *Vitis* Species in Year-To-Year Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13408-13417. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04907>
- García-Martínez, B. I., Ruiz-Ramos, M., Pedraza-Chaverri, J., Santiago-Osorio, E., & Mendoza-Núñez, V. M. (2023). Effect of Resveratrol on Markers of Oxidative Stress and Sirtuin 1 in Elderly Adults with Type 2 Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.*
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., & Velasco, R. (2008). Ripening and Genotype Control Stilbene Accumulation in Healthy Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11773-11785. <https://doi.org/10.1021/jf8017707>
- Godos, J., Marventano, S., Mistretta, A., Galvano, F., & Grosso, G. (2017). Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) study cohort. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(6), 750-756. <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1285870>
- Goldberg, D. M., Yan, J., & Soleas, G. J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*.
- Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Mądry, R., Szafraniec, K., & Pająk, A. (2014). Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. *Nutrition*, 30(11-12), 1398-1403. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.04.012>
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol : A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods : An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Ha, D. T., Kim, H., Thuong, P. T., Ngoc, T. M., Lee, I., Hung, N. D., & Bae, K. (2009). Antioxidant and lipoxigenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2), 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.019>
- Ha, D. T., Long, P. T., Hien, T. T., Tuan, D. T., An, N. T. T., Khoi, N. M., Van Oanh, H., & Hung, T. M. (2018). Anti-inflammatory effect of oligostilbenoids from *Vitis heyneana* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via suppressing the NF-κB activation. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0386-5>

- Habza-Kowalska, E., Kaczor, A. A., Bartuzi, D., Piłat, J., & Gawlik-Dziki, U. (2021). Some Dietary Phenolic Compounds Can Activate Thyroid Peroxidase and Inhibit Lipoxygenase-Preliminary Study in the Model Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5108. <https://doi.org/10.3390/ijms22105108>
- Hădărugă, N.-G., & Hădărugă, D.-I. (2022). Stilbenes and Its Derivatives and Glycosides. In S. M. Jafari, A. Rashidinejad, & J. Simal-Gandara (Éds.), *Handbook of Food Bioactive Ingredients : Properties and Applications* (p. 1-58). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-81404-5\\_14-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-81404-5_14-1)
- Hayasaka, N., Shimizu, N., Komoda, T., Mohri, S., Tsushida, T., Eitsuka, T., Miyazawa, T., & Nakagawa, K. (2018). Absorption and Metabolism of Luteolin in Rats and Humans in Relation to *in Vitro* Anti-inflammatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(43), 11320-11329. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03273>
- Hazra, B., Biswas, S., & Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-63>
- Hertog, M. G. L., & Hollman, P. C. H. (s. d.). *Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices?*
- Hollman, P. C. H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., & Vidry, S. (2011). The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established1–4. *The Journal of Nutrition*, 141, 989S-1009S. <https://doi.org/doi:10.3945/jn.110.131490>.
- Hoshino, J., Park, E.-J., Kondratyuk, T. P., Marler, L., Pezzuto, J. M., Van Breemen, R. B., Mo, S., Li, Y., & Cushman, M. (2010). Selective Synthesis and Biological Evaluation of Sulfate-Conjugated Resveratrol Metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(13), 5033-5043. <https://doi.org/10.1021/jm100274c>
- Hurst, W. J., Glinski, J. A., Miller, K. B., Apgar, J., Davey, M. H., & Stuart, D. A. (s. d.). *Survey of the trans-Resveratrol and trans-Piceid Content of Cocoa-Containing and Chocolate Products.*
- Iacopini, P., Baldi, M., Storch, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape : Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589-598. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.011>
- Ioannidis, K., Melliou, E., Alizoti, P., & Magiatis, P. (2017). Identification of black pine (*Pinus nigra* Arn.) heartwood as a rich source of bioactive stilbenes by qNMR : Identification of black pine heartwood as a rich stilbene source by qNMR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1708-1716. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8090>
- Ishisaka, A., Kawabata, K., Miki, S., Shiba, Y., Minekawa, S., Nishikawa, T., Mukai, R., Terao, J., & Kawai, Y. (2013). Mitochondrial Dysfunction Leads to Deconjugation of Quercetin

- Glucuronides in Inflammatory Macrophages. *PLoS ONE*, 8(11), e80843.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080843>
- Issaoui, M., Delgado, A. M., Caruso, G., Micali, M., Barbera, M., Atrous, H., Ouslati, A., & Chammem, N. (2020). Phenols, Flavors, and the Mediterranean Diet. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(4), 915-924. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qs018>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science*, 275(5297), 218-220. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clement, C., & Courrot, E. (s. d.). *Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants*.
- Jimenez-Gomez, Y., Mattison, J. A., Pearson, K. J., Martin-Montalvo, A., Palacios, H. H., Sossong, A. M., Ward, T. M., Younts, C. M., Lewis, K., Allard, J. S., Longo, D. L., Belman, J. P., Malagon, M. M., Navas, P., Sanghvi, M., Moaddel, R., Tilmont, E. M., Herbert, R. L., Morrell, C. H., ... de Cabo, R. (2013). Resveratrol Improves Adipose Insulin Signaling and Reduces the Inflammatory Response in Adipose Tissue of Rhesus Monkeys on High-Fat, High-Sugar Diet. *Cell Metabolism*, 18(4), 533-545. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.004>
- Juan, M. E., Maij6, M., & Planas, J. M. (2010). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Kaldas, M. I., Walle, U. K., & Walle, T. (2010). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(3), 307-312.  
<https://doi.org/10.1211/002235702612>
- Kardum, N., & Glibetic, M. (2018). Polyphenols and Their Interactions With Other Dietary Compounds : Implications for Human Health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 84.
- Keylor, M. H., Matsuura, B. S., & Stephenson, C. R. J. (2015). Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chem. Rev.*
- Khawand, T. E. (s. d.). *A review of dietary stilbenes : Sources and bioavailability*.
- Kim, J., Min, J. S., Kim, D., Zheng, Y. F., Mailar, K., Choi, W. J., Lee, C., & Bae, S. K. (2017). A simple and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for trans- $\alpha$ -viniferin quantification in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Kim, J.-S., Ha, T.-Y., Ahn, J.-Y., Kim, H.-K., & Kim, S.-A. (2008). Composition and Quantitative Analysis of Stilbenoids in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves and Fruits with DAD/UV HPLC. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(1), 124-128.  
<https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.1.124>

- Konings, E., Timmers, S., Boekschoten, M. V., Goossens, G. H., Jocken, J. W., Afman, L. A., Müller, M., Schrauwen, P., Mariman, E. C., & Blaak, E. E. (2014). The effects of 30 days resveratrol supplementation on adipose tissue morphology and gene expression patterns in obese men. *International Journal of Obesity*, 38(3), 470-473. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.155>
- Ku, K.-T., Huang, Y.-L., Huang, Y.-J., & Chiou, W.-F. (2008). Miyabenol A Inhibits LPS-Induced NO Production via IKK/I $\kappa$ B Inactivation in RAW 264.7 Macrophages : Possible Involvement of the p38 and PI3K Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8911-8918. <https://doi.org/10.1021/jf8019369>
- Kurin, E., Mučaji, P., & Nagy, M. (2012). In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures : An Interaction Study. *Molecules*, 17(12), 14336-14348. <https://doi.org/10.3390/molecules171214336>
- Kurundkar, D., Kurundkar, A. R., Bone, N. B., Becker, E. J., Liu, W., Chacko, B., Darley-Usmar, V., Zmijewski, J. W., & Thannickal, V. J. (2019). SIRT3 diminishes inflammation and mitigates endotoxin-induced acute lung injury. *JCI Insight*, 4(1), e120722. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120722>
- Lai, T. N. H., Herent, M.-F., Quetin-Leclercq, J., Nguyen, T. B. T., Rogez, H., Larondelle, Y., & André, C. M. (2013). Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa*. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1421-1430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.125>
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1977). *A new class of phytoalexins from grapevines*.
- Latva-Mäenpää, H., Laakso, T., Sarjala, T., Wähälä, K., & Saranpää, P. (2013). Variation of stilbene glucosides in bark extracts obtained from roots and stumps of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Trees*, 27(1), 131-139. <https://doi.org/10.1007/s00468-012-0780-x>
- Lee, J., & Rennaker, C. (2007). Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*, 105(1), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.069>
- Li, G., Zhu, Y., Zhang, Y., Lang, J., Chen, Y., & Ling, W. (2013). Estimated Daily Flavonoid and Stilbene Intake from Fruits, Vegetables, and Nuts and Associations with Lipid Profiles in Chinese Adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(6), 786-794. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.01.018>
- Liu, J., Huang, H., Huang, Z., Ma, Y., Zhang, L., He, Y., Li, D., Liu, W., Goodin, S., Zhang, K., & Zheng, X. (2019). Eriocitrin in combination with resveratrol ameliorates LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells and relieves TPA-induced mouse ear edema. *Journal of Functional Foods*, 56, 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.008>
- Liu, Z., & Hu, M. (2009). *Natural Polyphenol Disposition via Coupled Metabolic Pathways*.

- Lopes, R. M., Agostini-Costa, T. D. S., Gimenes, M. A., & Silveira, D. (2011). Chemical Composition and Biological Activities of Arachis Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4321-4330. <https://doi.org/10.1021/jf104663z>
- Lu, D., Ding, D., Yan, W., Li, R., Dai, F., Wang, Q., Yu, S., Li, Y., Jin, X., & Zhou, B. (2013). Influence of Glucuronidation and Reduction Modifications of Resveratrol on its Biological Activities. *ChemBioChem*, 14(9), 1094-1104. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300080>
- Lyons, M. M., Yu, C., Toma, R. B., Cho, S. Y., Reiboldt, W., Lee, J., & Van Breemen, R. B. (2003). Resveratrol in Raw and Baked Blueberries and Bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5867-5870. <https://doi.org/10.1021/jf034150f>
- Ma, Y., He, Y., Yin, T., Chen, H., Gao, S., & Hu, M. (2018). Metabolism of Phenolic Compounds in LPS-stimulated Raw264.7 Cells Can Impact Their Anti-inflammatory efficacy : Indication of Hesperetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 6042-6052. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04464>
- Mahjabeen, W. (2022). Role of resveratrol supplementation in regulation of glucose hemostasis, inflammation and oxidative stress in patients with diabetes mellitus type 2 : A randomized, placebo-controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*.
- Maier-Salamon, A., Böhmendorfer, M., Riha, J., Thalhammer, T., Szekeres, T., & Jaeger, W. (2013). Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1290(1), 98-106. <https://doi.org/10.1111/nyas.12198>
- Maier-Salamon, A., Böhmendorfer, M., Thalhammer, T., Szekeres, T., & Jaeger, W. (2011). Hepatic Glucuronidation of Resveratrol : Interspecies Comparison of Enzyme Kinetic Profiles in Human, Mouse, Rat, and Dog. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(4), 364-373. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-006>
- Majumdar, A. P. N., Banerjee, S., Nautiyal, J., Patel, B. B., Patel, V., Du, J., Yu, Y., Elliott, A. A., Levi, E., & Sarkar, F. H. (2009). Curcumin Synergizes With Resveratrol to Inhibit Colon Cancer. *Nutrition and Cancer*, 61(4), 544-553. <https://doi.org/10.1080/01635580902752262>
- Man-Ying Chan, M., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A., & Fong, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*, 60(10), 1539-1548. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00471-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00471-8)
- Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P., & Ducharme, M. P. (2002). Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats : Extent of Absorption, Glucuronidation, and Enterohepatic Recirculation Evidenced by a Linked-Rat Model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 369-373. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.033340>
- Mikstacka, R., Rimando, A. M., & Ignatowicz, E. (2010). Antioxidant Effect of trans-Resveratrol, Pterostilbene, Quercetin and Their Combinations in Human Erythrocytes In Vitro. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(1), 57-63. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0154-8>



- Mukherjee, S., Debata, P. R., Hussaini, R., Chatterjee, K., Baidoo, J. N. E., Sampat, S., Szerszen, A., Navarra, J. P., Fata, J., Severinova, E., Banerjee, P., & Castellanos, M. R. (2017). Unique synergistic formulation of curcumin, epicatechin gallate and resveratrol, tricurin, suppresses HPV E6, eliminates HPV+ cancer cells, and inhibits tumor progression. *Oncotarget*, 8(37), 60904-60916. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16648>
- Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., & Steinberg, P. (2009). Potent Antioxidative Activity of Vineatrol<sup>®</sup> 30 Grapevine-shoot Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1831-1836. <https://doi.org/10.1271/bbb.90213>
- Murakami, A., Takahashi, D., Koshimizu, K., & Ohigashi, H. (2003). Synergistic suppression of superoxide and nitric oxide generation from inflammatory cells by combined food factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524, 151-161. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00331-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00331-7)
- Muratori, L., Fregnan, F., Maurina, M., Haastert-Talini, K., & Ronchi, G. (2022). The Potential Benefits of Dietary Polyphenols for Peripheral Nerve Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Nassra, M., Krisa, S., Papastamoulis, Y., Kapche, G. D., Bisson, J., André, C., Konsman, J.-P., Schmitter, J.-M., Mérillon, J.-M., & Waffo-Téguo, P. (2013). Inhibitory activity of plant stilbenoids against nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Planta Medica*, 79(11), 966-970. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328651>
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer : An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010(0), bap024-bap024. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., Ippoushi, K., Oike, H., Nagata, T., Akasaka, H., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Kobori, M. (2015). *Estimated Daily Intake and Seasonal Food Sources of Quercetin in Japan*.
- Parul, R., Kundu, S. K., & Saha, P. (2013). In Vitro Nitric Oxide Scavenging Activity Of Methanol Extracts Of Three Bangladeshi Medicinal Plants. *The Pharma Innovation*, 1(12).
- Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., & Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(6), 1220-1228. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.007096>
- Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (s. d.). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols : An application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols : An application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(S3), S112-S120. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>

- Pezzani, R., Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zuñiga, F., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., & Martins, N. (2019). Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents : An Update on the Cancer Perspective. *Medicina*, 55(4), 110. <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>
- Pinto, P. (s. d.). Worldwide (poly)phenol intake : Assessment methods and identified gaps. *Eur J Nutr.*
- Pinto, P., & Santos, C. N. (2017). Worldwide (poly)phenol intake : Assessment methods and identified gaps. *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1393-1408. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1354-2>
- Piver, B., Fer, M., Vitrac, X., Merillon, J.-M., Dreano, Y., Berthou, F., & Lucas, D. (2004). Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysøgu, L. (2011). Plant Polyphenols : Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*
- Rabassa, M., Zamora-Ros, R., Urpi-Sarda, M., Bandinelli, S., Ferrucci, L., Andres-Lacueva, C., & Cherubini, A. (2015). Association of habitual dietary resveratrol exposure with the development of frailty in older age : The Invecchiare in Chianti study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(6), 1534-1542. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.118976>
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P. J., Little, J. M., Battaglia, E., & Mackenzie, P. I. (1999). STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES\*. *Drug Metabolism Reviews*, 31(4), 817-899. <https://doi.org/10.1081/DMR-100101944>
- Ragab, A. S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J.-H., & Bobzin, S. C. (2006). Detection and Quantitation of Resveratrol in Tomato Fruit ( *Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7175-7179. <https://doi.org/10.1021/jf0609633>
- Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R. O. (2015). Polyphenol Stilbenes : Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-24. <https://doi.org/10.1155/2015/340520>
- Reinli, K., & Block, G. (1996). Phytoestrogen Content of Foods—A Compendium of Literature Values. *Nutrition and Cancer*.
- Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Ballington, J. R. (s. d.). *Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in Vaccinium Berries*.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Méillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids : Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>
- Robbins, R. J. (s. d.). *Phenolic Acids in Foods : An Overview of Analytical Methodology*.

- Rokaya, M. B., Maršík, P., & Münzbergová, Z. (2012). Active constituents in *Rheum acuminatum* and *Rheum australe* (Polygonaceae) roots : A variation between cultivated and naturally growing plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, *41*, 83-90.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.11.004>
- Romain, C., Gaillet, S., Carillon, J., Vide, J., Ramos, J., Izard, J.-C., Cristol, J.-P., & Rouanet, J.-M. (2012). Vineatrol and Cardiovascular Disease : Beneficial Effects of a Vine- Shoot Phenolic Extract in a Hamster Atherosclerosis Model. *J. Agric. Food Chem.*
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Alshabrmi, F. M., Palai, S., Deb, P. K., & Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases : Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 806470.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>
- Samsamikor, M. (2016). Resveratrol Supplementation and Oxidative/Anti-Oxidative Status in Patients with Ulcerative Colitis : A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. *Archives of Medical Research.*
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, *130*(8), 2073S-2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, *24*(10), R453-R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sergent, T., Kohnen, S., Jourez, B., Beauve, C., Schneider, Y.-J., & Vincke, C. (2014). Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) heartwood extractives : Identification of resveratrol and piceatannol. *Wood Science and Technology*, *48*(5), 1005-1017. <https://doi.org/10.1007/s00226-014-0656-x>
- Seyyedebrahimi, S., Khodabandehloo, H., Nasli Esfahani, E., & Meshkani, R. (2018). The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes : A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetologica*, *55*(4), 341-353.  
<https://doi.org/10.1007/s00592-017-1098-3>
- Sharafan, M., Malinowska, M. A., Ekiert, H., Kwaśniak, B., Sikora, E., & Szopa, A. (2023). *Vitis vinifera* (Vine Grape) as a Valuable Cosmetic Raw Material.
- Shen, T., Wang, X.-N., & Lou, H.-X. (2009). Natural stilbenes : An overview. *Natural Product Reports*, *26*(7), 916. <https://doi.org/10.1039/b905960a>
- Sheridan, R., & Spelman, K. (2022). Polyphenolic promiscuity, inflammation-coupled selectivity : Whether PAINs filters mask an antiviral asset. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 909945.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.909945>
- Shi, G., Hua, M., Xu, Q., & Ren, T. (2017). Resveratrol improves treatment outcome and laboratory parameters in patients with Takayasu arteritis : A randomized double-blind and placebo-controlled trial. *Immunobiology*, *222*(2), 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.10.008>

- Silva, G. C., Rodrigues, R. A. F., & Bottoli, C. B. G. (2021). Passion fruit seed extract enriched in piceatannol obtained by microwave-assisted extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 22, 100472. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100472>
- Silvia, M. S., & Marcelo, G. de O. (2001). PHOTOSENSITIVITY OF AQUEOUS SODIUM NITROPRUSSIDE SOLUTIONS: NITRIC OXIDE RELEASE VERSUS CYANIDE TOXICITY. *Science Reviews*, Vol. 26, pp239-261.
- Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P., & Gupta, S. C. (2019). Health benefits of resveratrol : Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1851-1891. <https://doi.org/10.1002/med.21565>
- Sobolev, V. S. (2008). Localized Production of Phytoalexins by Peanut (*Arachis hypogaea*) Kernels in Response to Invasion by *Aspergillus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1949-1954. <https://doi.org/10.1021/jf703595w>
- Springer, M., & Moco, S. (2019a). Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients*, 11(1), 143. <https://doi.org/10.3390/nu11010143>
- Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*.
- Tabrizi, R., Tamtaji, O. R., Lankarani, K. B., Mirhosseini, N., Akbari, M., Dadgostar, E., Peymani, P., & Asemi, Z. (2018). The effects of resveratrol supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress among patients with metabolic syndrome and related disorders : A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Function*, 9(12), 6116-6128. <https://doi.org/10.1039/C8FO01259H>
- Taguchi, C., Fukushima, Y., Kishimoto, Y., Suzuki-Sugihara, N., Saita, E., Takahashi, Y., & Kondo, K. (2015). Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. *Nutrients*, 7(12), 10269-10281. <https://doi.org/10.3390/nu7125530>
- Teka, T. (2022). *Stilbenes : Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review*.
- Teka, T., Zhang, L., Ge, X., Li, Y., Han, L., & Yan, X. (2022). Stilbenes : Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review. *Phytochemistry*, 197, 113128. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113128>
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. K. C., Kunz, I., Schrauwen-Hinderling, V. B., Blaak, E. E., Auwerx, J., & Schrauwen, P. (2011). Calorie Restriction-like Effects of 30 Days of Resveratrol Supplementation on Energy Metabolism and Metabolic Profile in Obese Humans. *Cell Metabolism*, 14(5), 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.002>

- Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., García-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2012). One-Year Consumption of a Grape Nutraceutical Containing Resveratrol Improves the Inflammatory and Fibrinolytic Status of Patients in Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology*, *110*(3), 356-363.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.03.030>
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., Dávalos, A., Gil-Zamorano, J., González, M., García-Almagro, F. J., Ruiz Ros, J. A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & García-Conesa, M.-T. (2013). One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacological Research*, *72*, 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.011>
- Tresserra-Rimbau, A. (s. d.). *Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk : The PREDIMED study*.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M. A., Saez, G. T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2013). Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk : The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *23*(10), 953-959.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.10.008>
- Tsai, C.-F., Wang, K.-T., Chen, L.-G., Lee, C.-J., Tseng, S.-H., & Wang, C.-C. (s. d.). *Anti-Inflammatory Effects of Vitis thunbergii var. Taiwaniana on Knee Damage Associated with Arthritis*.
- Tsai, C.-F., Wang, K.-T., Chen, L.-G., Lee, C.-J., Tseng, S.-H., & Wang, C.-C. (2014). Anti-Inflammatory Effects of *Vitis thunbergii* var. *Taiwaniana* on Knee Damage Associated with Arthritis. *Journal of Medicinal Food*, *17*(4), 479-486. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2914>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231-1246.  
<https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L. P., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B. B., Maróstica, M. R., & Martínez, J. (2016). Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, *85*, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.015>
- Vion, E., Page, G., Bourdeaud, E., Paccalin, M., Guillard, J., & Rioux Bilan, A. (2018). Trans  $\epsilon$ -viniferin is an amyloid- $\beta$  disaggregating and anti-inflammatory drug in a mouse primary cellular model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *88*, 1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.12.003>

- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., Mérillon, J.-M., & Teissédre, P.-L. (2005). Determination of Stilbenes ( $\delta$ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*—And *trans*-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5664-5669. <https://doi.org/10.1021/jf050122g>
- Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J., & Merillon, J.-M. (2003). Distribution of [ $^{14}$ C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sciences*.
- Vivancos, M., & Moreno, J. J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and  $\beta$ -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition*, 99(6), 1199-1207. <https://doi.org/10.1017/S0007114507876203>
- Vong, C. I., Rathinasabapathy, T., Moncada, M., & Komarnytsky, S. (2022). All Polyphenols Are Not Created Equal : Exploring the Diversity of Phenolic Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(7), 2077-2091. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07179>
- Waffo-Téguo, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., & Mehta, R. G. (2001). Potential Cancer-Chemopreventive Activities of Wine Stilbenoids and Flavans Extracted From Grape (Vi. *Nutrition and Cancer*.
- Walker, J., Schueller, K., Schaefer, L.-M., Pignitter, M., Esefelder, L., & Somoza, V. (2014). Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food Funct.*, 5(1), 74-84. <https://doi.org/10.1039/C3FO60236B>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., & Walle, U. K. (2004). HIGH ABSORPTION BUT VERY LOW BIOAVAILABILITY OF ORAL RESVERATROL IN HUMANS. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377-1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Wang, K.-T., Chen, L.-G., Tseng, S.-H., Huang, J.-S., Hsieh, M.-S., & Wang, C.-C. (2011). Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol and Oligostilbenes from *Vitis thunbergii* var. *Taiwaniana* against Lipopolysaccharide-Induced Arthritis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3649-3656. <https://doi.org/10.1021/jf104718g>
- Wang, L.-X., Heredia, A., Song, H., Zhang, Z., Yu, B., Davis, C., & Redfield, R. (2004). Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans : Characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 93(10).
- Wang, P., & Sang, S. (s. d.). *Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene*.
- Willenberg, I. (2015). Investigation of the absorption of resveratrol oligomers in the Caco-2 cellular model of intestinal absorption. *Food Chemistry*.
- Xiao, K. (s. d.). *Stilbenoids : Chemistry and bioactivities*.
- Xiao, K., Xuan, L., Xu, Y., Bai, D., Zhong, D., Wu, H., Wang, Z., & Zhang, N. (2002). Dimeric Stilbene Glycosides from *Polygonum cuspidatum*. *Eur. J. Org. Chem*.

- Yavuz, S., Aydin, N., Celik, O., Yilmaz, E., Ozerol, E., & Tanbek, K. (2014). Resveratrol successfully treats experimental endometriosis through modulation of oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *10*(2), 324. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.136619>
- Yu, O., & Jez, J. M. (2008). Nature's assembly line : Biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *The Plant Journal*.
- Yum, S., Jeong, S., Lee, S., Nam, J., Kim, W., Yoo, J.-W., Kim, M.-S., Lee, B. L., & Jung, Y. (2015). Colon-targeted delivery of piceatannol enhances anti-colitic effects of the natural product : Potential molecular mechanisms for therapeutic enhancement. *Drug Design, Development and Therapy*, *9*, 4247-4258. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S88670>
- Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Martínez, C., Sánchez, M. J., Navarro, C., Chirlaque, M. D., Tormo, M.-J., Quirós, J. R., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larrañaga, N., Barricarte, A., Ardanaz, E., & González, C. A. (s. d.). Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population : European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *British Journal of Nutrition*.
- Zghonda, N., Yoshida, S., Araki, M., Kusunoki, M., Mliki, A., Ghorbel, A., & Miyazaki, H. (2011). Greater Effectiveness of  $\epsilon$ -Viniferin in Red Wine Than Its Monomer Resveratrol for Inhibiting Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *75*(7), 1259-1267. <https://doi.org/10.1271/bbb.110022>
- Zhang, L., Wang, X., & Si, H. (2022). Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of the combination of resveratrol and curcumin in human vascular endothelial cells and rodent aorta. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *108*, 109083. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109083>
- Zhou, X., Afzal, S., Zheng, Y.-F., Münch, G., & Li, C. G. (2021). Synergistic Protective Effect of Curcumin and Resveratrol against Oxidative Stress in Endothelial EAhy926 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2021*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2021/2661025>
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y.-S., Zhan, D., Chen, Y.-L., He, Y., Liu, J., Zhang, Z.-J., Sun, J., & Lu, D. (2012). Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PloS One*, *7*(8), e44107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044107>