

Université du Québec
Institut National de la Recherche
Scientifique
Centre Armand-Frappier santé
biotechnologie

Université de Rennes 1
COMUE Université Bretagne Loire
Ecole Doctorale n° 596
Matière Molécules et Matériaux

Cotutelle de thèse

POTENTIALISATION DES EFFETS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES COMBINÉS DE L'HUILE D'OLIVE : ÉTUDE DES TRANSFORMATIONS REDOX.

APPLICATION DANS LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES.

Par

Morgane Lambert de Malezieu

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie et en chimie analytique

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur
interne

Pr. Charles Gauthier,
INRS-Centre Armand-Frappier, Laval, Canada.

Examineurs externes

Dr. Sylvain Guyot
INRA, Le Rheu, France.

Pr. Yves Desjardins
INAF, Université de Laval, Québec, Canada

Co-Directeurs de recherche

Pr. Charles Ramassamy
INRS-Centre Armand-Frappier, Laval, Canada.

**Dr. Marie-Laurence Abasq, Maître de
conférences,**
Université de Rennes 1, Rennes, France

Pr. Sophie Tomasi,
Université de Rennes 1, Rennes, France

REMERCIEMENTS

L'histoire doctorale est propre à chacun, j'en suis convaincue. Les hauts et les bas d'un point de vue scientifique, mais surtout personnel nous poussent dans nos extrêmes et nous font grandir. Je reste persuadée que l'exercice n'est pas fait pour tout le monde. Seule une minorité d'individus, probablement les plus coriaces ou les plus fous, pourront aller au bout. Je remercie infiniment tous ces personnages qui ont été, sont ou seront des doctorants pour leur énergie, leur motivation et leur persévérance. La résonance de vos travaux nous pousse à aller toujours plus loin.

Je tiens à remercier en premier lieu **Marie-Laurence Abasq**, sans qui rien n'aurait pu voir le jour. Tu as organisé cette conférence à Rennes qui un jour m'a conduit face au Pr. Charles Ramassamy. Ton respect pour la science, ta conviction que nous pouvons changer les choses petit à petit (un pas après l'autre on avance..), ta patience et ta persévérance m'ont permis de poursuivre ce travail. Je dis bien poursuivre, car cela n'a pas toujours été simple et nous nous sommes souvent senties dépassées. Mais grâce à ton énergie, ta convivialité, ton humour et surtout ton humanité, les résultats sont là. Tu as su m'apporter de l'énergie et de la motivation quand je venais à en manquer. Tu m'as montré que la science pouvait faire partie d'une vie épanouie. Pour tout cela je te remercie.

Naturellement, je souhaite remercier profondément le **Pr. Charles Ramassamy**. Tu m'as accueillie dans ton laboratoire de l'autre côté de l'océan. J'étais en quête d'approfondissements scientifiques... je peux dire que j'ai été servie !! Tu as su me pousser dans mes retranchements tant d'un point de vue scientifique que personnel. Les challenges permanents m'ont permis non seulement de développer mon esprit critique, mais aussi de me développer personnellement. À l'heure où j'écris ces lignes, je me pose encore la question de savoir si durant ce doctorat j'ai plus appris en sciences ou sur moi-même. Je sais aujourd'hui les défis que je peux relever, je sais me préserver, et surtout, je sais rester en harmonie avec mes valeurs. Pour tout cet enseignement, je te remercie.

Sophie Tomasi, tu as répondu présente à la seconde où l'on a eu besoin de toi. Pour cela je te suis infiniment reconnaissante. Tu as accepté de co-superviser mon travail et d'y amener ton savoir très rapidement, je peux même le dire, dans l'urgence. Tu as répondu présente sur tous les points, tu as su t'adapter à nos méthodes de travail sans jamais faire preuve d'exaspération, d'impatience ou de jugement. Ton apport précieux a permis à ce projet de prendre un tournant

particulièrement intéressant. Ton sourire et ta bonne humeur auront été extrêmement précieux pour la réalisation de ce travail.

Je souhaite aussi remercier **Joël Boustie**, qui a accepté de m'accueillir au sein de son équipe et de mettre à ma disposition tous les éléments nécessaires pour que je puisse mener ce projet le plus loin possible.

Bien entendu, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à la lecture de mon document de thèse, de m'avoir soumis leurs conseils et leurs expertises pour l'évaluation de mes travaux de recherches. Je remercie le **Pr. Charles Gauthier** d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je remercie également le **Pr. Sylvain Guyot** et le **Pr. Yves Desjardins** d'avoir accepté d'y participer en tant qu'évaluateurs externes. Je tiens également à remercier les membres du jury de mes précédents examens pour leurs conseils tout au long de mes travaux de recherche (je pense aux **Pr. Thomas Sanderson**, le **Pr. Odile Sergent** et le **Pr. Kessen Patten**).

Je souhaite remercier **Patricia Courtel** pour ton aide précieuse avec ces (fichues !!) électrodes. Tu as tenté de me transmettre une partie de ton savoir-faire, toujours avec patience, persévérance et humour. Un énorme merci aussi à **Aurélie Sauvager** et **Solenn Ferron**. Vous avez eu la gentillesse de continuer les expériences à Rennes alors que j'étais au Canada pour continuer de faire avancer ce projet. Sans vous, une bonne partie de ce travail n'aurait pas pu voir le jour. De plus, je tiens à remercier toute l'équipe de Rennes pour leur soutien et leurs conseils.

Je souhaite remercier aussi tous mes collègues et amis de Rennes et de l'INRS. Plus particulièrement **Morgane Perrotte** avec qui nous avons affronté ce long chemin. Merci pour tes conseils, tes encouragements, ta gentillesse et ton sens humain. Nos parcours se sont croisés tardivement, mais apprendre à te connaître a probablement été l'une des expériences les plus agréables de ce doctorat. Évidemment, **Abdenour Belkacémi**, tu as participé de façon singulière à me faire aimer le détail. Sans toi, tes conseils et ton soutien, je ne me serais peut-être pas engagée dans cette voie. Évidemment, je tiens à remercier chaleureusement **Erell Le Deun** pour ses conseils, son accompagnement et ses doutes ! Nos fous rires résonnent encore ! Merci de m'avoir introduit dans le monde secret des polyphénols ! Merci aussi à **Servane Bigot**. Tu as été un rayon de soleil durant mon séjour à Rennes !

Je tiens aussi à remercier **Jean-Michel Rabanel** pour ses conseils avisés et son écoute, ainsi que tous les autres membres du laboratoire de Charles Ramassamy : **Vincent Hervé**, des hauts

et des bas, mais toujours avec le sourire, **Mohammed Haddad**, **Sarra Landri** et **Raâfet Ben Khedher**.

De même, **Étienne Billard** et **Mathilde Pujol de Molliens**, vous êtes devenus des amis sur lesquels j'ai toujours pu, et je sais que je pourrais toujours, compter. Pour être ce que vous êtes, un grand merci.

Enfin, je souhaite remercier mes proches. Sans leur soutien, l'épreuve aurait été franchement désagréable. Merci infiniment à **Lucien Omer Nirrenold**. Sans toi rien n'aurait été pareil. Tu resteras toujours une pierre angulaire de ma construction personnelle. Notre parcours semé d'embûches envers et contre tous m'a donné les prémices nécessaires à l'aboutissement de ce doctorat. Évidemment ma grande sœur, **Marine Lambert de Malezieu**, qui a eu la gentillesse de m'accorder un neveu qui me permet de toujours tout relativiser !! (Eh oui, on a qu'à prendre un hélicoptère pour aller voir Tatie ?!). Merci à mon frère, **Harald Lambert de Malezieu**, pour son humour, sa délicatesse et ses encouragements. Je n'attends qu'une chose c'est que tu te trouves toi aussi !! Bien évidemment, je remercie mon papa, **Nicolas Lambert**. Éternel insatisfait, tu m'as toujours poussée dans tout ce que j'ai entrepris. Pour cela je te suis très reconnaissante. Ton éducation m'a donné de solides bases pour pouvoir déployer mes ailes. Ton soutien distant, mais toujours présent est un socle de sécurité qui m'a permis d'œuvrer là ou bon me semble. Pour cela je ne te remercierais jamais assez. Je tiens aussi à remercier ma grand-mère, **Monique Lambert**. Je sais que tu aurais préféré que je sois près de toi plus souvent, mais ta justesse et ton amour ont toujours pu nous rapprocher (vive Skype !). Enfin maman, **Nadine De Malezieu**. Merci. Tu es l'exemple que j'ai suivi bien malgré moi. J'ai cru choisir des chemins qui m'éloignaient de ton influence, mais je me suis rendue compte que rien n'y fait. Je suis ta trace. Tu as entamé un parcours semé d'embûches à ton époque, moins à la mienne, mais qui demande tout de même certains défis. Jusqu'à présent, ton exemple m'a permis de les relever, et j'espère ne pas m'arrêter en si bon chemin. Je te remercie infiniment pour ces graines que tu as semées en moi.

Cette revue sentimentale ne serait pas complète sans évoquer encore deux ou trois personnages. Plus particulièrement ceux qui n'ont pas eu la patience d'attendre la fin de ce travail pour nous quitter. **Brice** et **Granny**, vous me faites aujourd'hui cruellement défaut et j'aurais aimé que vous puissiez être là pour comprendre mon absence durant vos derniers jours.

Enfin et non des moindres, je tiens à remercier singulièrement mon plus fidèle *supporter*, celui qui a toujours tenu, jour et parfois nuit, couché sur mon épaule à attendre ce moment inespéré où l'ordinateur allait s'éteindre, **Mogoai** (allias Loulou). Tu m'accompagnes depuis le début de mes

études universitaires – 11 années – et rien que pour cela tu mérites une médaille !! Ton amour inconditionnel m'a toujours ramené à la vérité existentielle. Merci infiniment de ta patience.

RÉSUMÉ

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (MA et MP) sont des maladies du système nerveux central caractérisées par une mort progressive des neurones et une diminution des fonctions cognitives et locomotrices. Les projections démographiques annoncent que 28 % de la population aura plus de 65 ans d'ici 2050. Ce constat implique le risque d'augmentation de la prévalence de ces maladies liées à l'âge. L'OMS estime que 25 à 30 % des personnes âgées de plus de 85 ans sont atteintes de troubles cognitifs. Ce chiffre atteindra 82 millions de cas déclarés d'ici 2030. De plus, malgré plusieurs décennies de recherches, les traitements curatifs font aujourd'hui toujours défaut.

Contrairement aux formes génétiques dont les mutations sont connues, les formes sporadiques qui représentent 95 % des cas la MA et de la MP sont d'origines inconnues, mais leur survenue est vraisemblablement liée à plusieurs facteurs. Au cours du vieillissement, l'accumulation des dommages oxydatifs au niveau cérébral augmente, ce qui en fait le premier facteur de risque. En effet, bien que plusieurs hypothèses ont été émises, il semble que le stress oxydatif soit le facteur commun à tous les dysfonctionnements physiopathologiques observés dans la MA et dans la MP. C'est pourquoi plusieurs stratégies basées sur les antioxydants d'origine alimentaire ont été testées, mais sans réussite majeure. Il est aujourd'hui admis que l'apport alimentaire peut agir soit en tant que facteur de risque, notamment dans les diètes de types Western, ou au contraire en tant que facteurs préventifs. C'est le cas de la diète méditerranéenne (MeDi). L'adhésion à ce régime atténuerait la survenue des démences liées à la neurodégénération telles qu'observées dans la MA ou la MP. À l'échelle cellulaire et moléculaire, les origines de ces bénéfices ne sont pas clairement identifiées. Plusieurs éléments composant cette diète, tels que les apports importants de végétaux, d'acide gras de type oméga 3 et la consommation modérée de vin rouge sont suspectés de jouer un rôle dans les effets bénéfiques observés. Mais la consommation d'huile d'olive a majoritairement retenu l'attention, notamment grâce aux polyphénols qu'elle contient. Plus particulièrement, l'oleuropéine, un sécoiridoïde, le tyrosol, un monophénol ou encore l'acide *para*-coumarique, un acide phénolique, seraient susceptibles de contrecarrer la mort des neurones induite par un stress oxydatif à travers leurs propriétés antioxydantes intrinsèques, mais aussi à travers leurs capacités à moduler les systèmes de défenses antioxydantes endogènes.

À ce jour, ces composés ont avant tout été étudiés de manière isolée afin de caractériser leur réactivité vis-à-vis des radicaux et leurs effets biologiques. Or, les concentrations en composés phénoliques utilisées pour observer une neuroprotection (entre 2,7 µg/ml pour l'oleuropéine et 13,8 µg/ml pour le tyrosol) sont éloignées des concentrations en composés phénoliques retrouvées dans le plasma (0.5 - 2,8 ng / ml de plasma). Jusqu'à présent, aucune étude n'a observé les effets de ces composés combinés selon une formulation spécifique, alors que l'oleuropéine et le tyrosol, des composés phénoliques parmi les plus abondants dans l'huile d'olive et que l'acide *p*-coumarique, un dérivé d'acide hydroxycinnamique, sont connus pour leurs activités antioxydantes et leur biodisponibilité.

Dans un contexte cellulaire, les composés phénoliques agissent à travers leurs capacités de donateurs d'atomes d'hydrogène et / ou d'électrons, mais aussi en impactant la régulation des défenses antioxydantes endogènes. En outre, en conditions oxydatives, telles qu'observées dans les neurones en cas de stress oxydatif, ou encore lors du tractus gastro-intestinal, les composés phénoliques peuvent subir des modifications structurelles et mener à des produits issus de leur oxydation. L'impact cellulaire de ces derniers est encore peu étudié, car le devenir de ces composés dans le contexte d'un métabolisme oxydatif reste obscur. C'est pourquoi l'étude des métabolites issus de l'oxydation des composés phénoliques est d'une réelle importance afin d'approfondir les connaissances sur leurs mécanismes d'actions au niveau biologique.

Compte tenu des connaissances actuelles sur les composés phénoliques de l'huile d'olive, de leurs mécanismes d'action et d'oxydation, associées aux caractéristiques cellulaires de la MA et de la MP, nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique potentialise leurs effets neuroprotecteurs à travers leurs capacités de donateurs d'électrons et en lien avec la production des métabolites associés. La particularité de ce travail réalisé en cotutelle de thèse est de proposer une approche pluridisciplinaire intégrant des composantes biologiques, à travers l'utilisation d'outils de biologie cellulaire et moléculaire, et des questions relevant de la physicochimie, en s'appuyant sur des outils électrochimiques qui permettent l'étude des transferts d'électrons en solution simplifiée.

En premier lieu, nous avons démontré que l'association de ces trois composés phénoliques (Mix 1) permettait de potentialiser leurs effets neuroprotecteurs dans un système de cellules neuronales traitées avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), un inducteur de stress oxydatif. Nous avons observé que dans le Mix 1 la réactivité des composés phénoliques était augmentée vis-à-

vis du H_2O_2 et du radical superoxyde (O_2^{\bullet}) en comparaison de leur activité individuelle. De plus, cette formulation nous a permis de diminuer les concentrations efficaces des composés phénoliques à 0.1 et 1 μ M, contrairement aux concentrations nécessaires (5 à 10 fois plus élevées) pour observer une neuroprotection lorsque ces composés sont utilisés individuellement. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (EROS) intracellulaires a pu être diminuée dès une heure de traitement, tout comme les niveaux de protéines oxydées. Cette neuroprotection semble médiée par une régulation du facteur rédox Nrf2 et par l'inhibition du facteur Nf- κ B, facteur impliqué dans la génération des processus inflammatoires.

Dans un second temps, nous avons choisi de comparer le comportement en conditions oxydatives et acellulaires de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique individuellement, mais aussi lorsqu'ils sont associés en proportion équimolaire. Pour cela, nous avons utilisé les outils électrochimiques, où l'électrode joue le rôle d'oxydant initial, couplés à un spectrophotomètre UV-Vis, pour nous permettre de suivre en temps réel les modifications d'absorption UV-Vis. Les solutions oxydées ont été analysées par LC-MS² afin d'observer les composés stables générés lors de l'oxydation. Nous avons observé que l'oxydation du Mix 1 induisait une diminution du taux d'oxydation relatif de chacun des composés phénoliques présents dans le mélange. . Ainsi, les dimères des deux monophénols (acide *p*-coumarique et tyrosol) observés lors de leur oxydation individuelle n'étaient plus visibles. Par ailleurs, nous avons détecté trois néocomposés spécifiques de l'oxydation du Mix 1, de *m/z* 299 et 675, probablement issus de couplages des formes natives et oxydées de composés phénoliques mis en jeu. Enfin, nous avons mis en évidence un effet neuroprotecteur des composés issus de l'oxydation du Mix 1 dès 1 et 5 nM, ce qui soutient l'hypothèse que les produits issus de l'oxydation des composés phénoliques peuvent participer aux effets biologiques des composés natifs.

Notre troisième objectif était d'évaluer si les composés issus de l'oxydation des composés phénoliques pouvaient être générés dans un système biologique. Nous avons donc utilisé notre modèle de cellules neuronales, soumises à un stress oxydatif grâce au H_2O_2 , pour générer des conditions oxydatives à travers l'augmentation intracellulaire de la production de ROS telle qu'observée au début de ce travail. Après extraction et concentration des composés phénoliques contenus dans les extraits intra et extra- cellulaires, nous avons analysé ces échantillons en LC-HRMS. Nous avons observé que ces composés phénoliques étaient toujours présents sous leurs formes natives dans les cellules neuronales après plusieurs heures de traitement, mais nous

n'avons pas été en mesure de démontrer l'existence des néocomposés issus de l'oxydation des composés phénoliques tels qu'observés dans la seconde partie de ce travail ou dans la littérature.

Ce projet multidisciplinaire, mêlant les outils biologiques et les outils de chimie analytique, a permis d'observer les effets des composés phénoliques sous plusieurs angles. En effet, à l'heure actuelle, l'utilisation d'outils spécifiques, autrefois réservés à une seule discipline, permet d'aborder l'étude mécanistique des effets neuroprotecteurs des composés phénoliques d'un point de vue biologique et d'un point de vue structural. De plus, ce travail démontre l'intérêt d'une formulation spécifique de composés phénoliques afin d'intervenir plus efficacement dans la lutte contre la neurodégénérescence à l'origine du déclin cognitif caractéristique de la MA et de la MP. De plus, au-delà de la difficulté de séparer l'activité biologique due aux composés phénoliques natifs de celle due aux métabolites issus de leur oxydation, notre travail confirme qu'un effet neuroprotecteur de nouveaux composés, obtenus après oxydation, est possible et ouvre la voie à de nouvelles approches pour le développement de formulation efficace pour limiter le stress oxydatif au niveau cérébral.

ABSTRACT

Alzheimer and Parkinson diseases (AD and PD) are neurodegenerative disorders characterized by progressive neuronal death and associated cognitive function decline. Demographic projection announces that 28 % of the worldwide population will have more than 65 years in 2050, which increases the risk of age-related diseases like AD or PD. According to the WHO, 25 to 30 % of people older than 85 years will develop a cognitive disorder, reaching 85 billion people by 2030. Despite intensive researches have been done since decades, curative treatments are still missing.

Familial forms with known mutations represent less than 10 % of AD and PD cases while the sporadic forms, with unknown causes, are multifactorial. During aging, cerebral oxidative damages increases leading to neuronal death. Indeed, among different hypothesis, it is well recognized that oxidative burden is one of the major common and early factors in AD or PD and represents one of the main targets to counteract. Several antioxidant-based strategies were tested with limited success.

On the other hand, it is widely accepted that Western diet increases the risk of AD and PD while higher adhesion to the Mediterranean diet type (MeDi) decreases the onset of AD or PD. Although the cellular and molecular mechanisms underlying the beneficial effects of the MeDi diet are not well understood, it could prevent or slow down cognitive decline through neuronal preservation. Among vegetables, omega 3 fatty acids and moderate red wine consumption, olive oil intake received strong interests, notably for its high and specific phenolic content. Indeed, some phenolic compounds from olive oil have direct antioxidant properties as electrons or H-atom donors, which are largely suspected of being responsible for their biological effects, but also of some indirect properties as modulators of endogenous antioxidant defences regulators. The secoiridoid oleuropein and the monophenols tyrosol and *p*-coumaric acid have shown abilities to counteract oxidative injuries and associated neuronal death in several cellular and *in vivo* models. However, the basic mechanisms of action of phenolic compounds remain to be elucidated. In fact, phenolic compounds are highly sensitive to oxidative modifications and could be transformed into new compounds in an oxidative context. Cellular impacts of these products are rarely considered, probably because their intracellular detection is a great challenge and remain an important field to explore. Moreover, oleuropein, tyrosol and *p*-coumaric were individually evaluated in order to characterize their own reactivity towards ROS and their biological properties. However, the concentration ranges used to observe neuroprotection in cellular models (5 – 100 μ M) were far

from the possibly recovered phenolic concentration in plasma (0.5 – 2.8 ng /ml of plasma). To observe an effect with concentration range closer to the physiological ones, several antioxidant combinations could be proposed. However, despite the biological promises of phenolic compounds from olive oil, studies which combined some of the most abundant phenolic compounds in the neuroprotection field are still missing.

Taking into account the actual knowledge about these phenolic compounds and their potential impact on neurodegenerative disorders like AD or PD, we have hypothesized that the combination of oleuropein, tyrosol, and *p*-coumaric acid in equimolar proportion (Mix 1) could potentiated their ROS scavenging and neuroprotective properties to counteract oxidative stress-induced neuronal death. These effects could be in part due to their oxidized metabolites.

This work was realized in cotutelle with a pluridisciplinary approach. Biological effects were evaluated using neuronal cell model, while oxidative behaviours of the Mix 1 were studied using electrochemical tools, allowing electron transfer studies in simplified model solutions.

First, using electrochemical methods, we have observed that the reactivity of the Mix 1 towards two ROS, the hydrogen peroxide and the superoxide anion radical, was higher than those of individual compounds. On neuronal SK-N-SH cells challenged with oxidative stress inducer H₂O₂ or Paraquat, low concentrations (0.1 μM and 1 μM) of the Mix1 were able to decrease neuronal death. These neuroprotective effects were supported by a decrease in intracellular ROS, in the protein carbonyl levels and in the prevention of the activation of the redox sensitive factors Nrf2 and NF-κB. These intracellular effects were supported by the demonstration of the internalization of these ArOH-EVOO into neuronal cells, highlighted by LC-HRMS.

Then, we were interested to go deeper into their oxidative properties when mixed in equimolar proportion. Oleuropein, tyrosol and *p*-coumaric acid were submitted to spectroelectrochemical oxidation study, either individually or in equimolar mixtures. The comparison of LC-ESI-MS² profiles of each ArOH-EVOO, in native forms or after oxidation, highlighted the presence of specific oxidized products found in Mix 1. We hypothesized that they derived from the heterodimerization between Ole, Tyr or *p*-Cou, which have reacted either in native or in oxidized form. We observed a regeneration of oleuropein when oxidized in the Mix 1, probably through coupled redox reactions between its oxidized quinone form and other compounds. This study also showed a significant neuroprotection of oxidized Ole and oxidized Mix against H₂O₂ toxicity, after

24 h of treatment with very low concentrations (1 and 5 nM), suggesting the putative relevant role of oxidized Ole products to protect or delay neuronal death.

Our third objective was to evaluate if these oxidized metabolites from the Mix 1 or from individual compounds could be produced in our cellular model challenging with oxidative inducer. Even under oxidative conditions, we recovered these compounds in cellular extracts under their native forms after few hours of treatments, attesting their accumulation in neuronal cells. We observed metabolites from oleuropein hydrolysis and tyrosol-sulfate, attesting some intracellular metabolism, but, we were unable so far to detect any metabolites from oxidized phenolic compounds. Taking together, our results demonstrated the relevance of a strategic phenolic compounds formulation to fight against oxidative injuries in neurodegenerative diseases like AD and PD. Moreover, we pointed out the relevance to study the phenolic compounds from a chemical and a biological point of view, which should always be as cellular redox reactions are between biological and chemical fields. Lastly, we confirmed the significance to take into account the oxidized metabolites from phenolic compounds to deeper understand their biological properties.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	X
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
TABLE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XXII
CHAPITRE 1	1
I. LE STRESS OXYDATIF OU DÉSÉQUILIBRE DE L'ÉTAT REDOX	2
I.A. <i>Les espèces réactives de l'oxygène</i>	2
I.A.a. Généralités.....	2
I.A.b. L'anion superoxyde.....	4
I.A.c. Le peroxyde d'hydrogène	5
I.A.d. Les autres EROs secondaires	5
I.B. <i>Les sources de radicaux</i>	6
I.B.a. Endogènes.....	6
I.B.b. Exogènes.....	9
I.C. <i>Définition du stress oxydatif</i>	10
I.D. <i>Les modifications oxydatives des macromolécules cellulaires</i>	11
I.D.a. Oxydation des protéines :	11
I.D.b. Peroxydation lipidique :	12
I.D.c. Oxydation des acides nucléiques :	14
I.E. <i>Les systèmes de défenses antioxydantes</i>	14
I.E.a. Définition d'un antioxydant	14
I.E.b. Les antioxydants directs.....	15
I.E.c. Les enzymes de défenses antioxydantes	15
I.E.d. Facteurs de régulations de l'état rédox	17
II. LA MALADIE D'ALZHEIMER ET LA MALADIE DE PARKINSON : DES MALADIES LIÉES AU STRESS OXYDATIF.....	20
II.A. <i>Généralités</i>	20
II.B. <i>Caractéristiques physiopathologiques</i>	20
II.B.a. Atrophies cérébrales.....	20
II.B.b. Protéinopathies	21

II.B.c.	Des maladies évolutives.....	22
II.C.	Facteurs de risques	23
II.C.a.	Génétiques.....	23
II.C.b.	Facteurs non génétiques.....	24
II.D.	Le stress oxydatif dans la Maladie d'Alzheimer et la Maladie de Parkinson	26
II.D.a.	Sensibilité du cerveau à l'oxygène	27
II.D.b.	Augmentation des marqueurs du stress oxydatif	27
II.D.c.	Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie	29
II.D.d.	Dérégulation des facteurs redox.....	33
II.D.e.	Apparition précoce du stress oxydatif dans le développement de la Maladie d'Alzheimer et la Maladie de Parkinson	34
II.E.	Traitements actuels	35
II.E.a.	Absence de moyen thérapeutique efficace	35
II.E.b.	Stratégie des antioxydants.....	35
III.	LA DIÈTE MÉDITERRANÉENNE POUR LIMITER L'INCIDENCE DU STRESS OXYDATIF ET LE DÉCLIN COGNITIF	38
III.A.	Caractéristiques nutritionnelles de la diète Méditerranéenne	38
III.B.	Bénéfices pour la santé.....	39
III.B.a.	Augmentation de l'espérance de vie et incidence sur les maladies chroniques	39
III.B.b.	Prévention du déclin cognitif.	40
III.C.	Cas particulier de l'huile d'olive	41
III.C.a.	L'or de la Diète MeDi	41
III.C.b.	Amélioration des fonctions cognitives	42
IV.	LES POLYPHÉNOLS AU SERVICE DE LA STRATÉGIE DES ANTIOXYDANTS	45
IV.A.	Généralités.....	45
IV.B.	Focus sur les composés phénoliques de l'huile d'olive	47
IV.B.a.	Composition générale	47
IV.B.a.	Bénéfices pour la santé – antioxydants.....	48
IV.B.b.	Effets neuroprotecteurs	56
IV.B.c.	Biodisponibilité	57
IV.C.	Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques.....	62
IV.C.a.	Antioxydants directs	62
IV.C.b.	Étude des propriétés antioxydantes des composés phénoliques	73
V.	COMBINAISON DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	86
	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	89
	CHAPITRE 2	93
I.	RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE 1 :	93

II.	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE 1 :	94
III.	ARTICLE 1	95
CHAPITRE 3		121
I.	RÉSUMÉ ET OBJECTIFS DE L'ARTICLE 2 :	121
II.	CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT À L'ARTICLE 2 :	122
III.	ARTICLE 2	124
CHAPITRE 4		155
I.	INTRODUCTION	156
II.	MÉTHODES	159
II.A.	<i>Modèle cellulaire</i>	159
II.B.	<i>Traitements des cellules</i>	159
II.C.	<i>Récolte des cellules et extraction des composés phénoliques :</i>	160
II.D.	<i>Analyses par LC-ESI-TOF-MS²</i>	161
	Méthode d'identification	162
II.D.a.	Analyse ciblée	162
II.D.b.	« Suspect screening »	162
III.	ANALYSE DES RÉSULTATS ET DISCUSSION	165
III.A.	<i>Analyse Ciblée</i>	165
III.B.	« Suspect screening »	167
III.B.a.	Screening des molécules déprotonées [M-H] ⁻ avec modifications enzymatiques de phase 2	168
III.B.b.	Screening des molécules déprotonées [M-H] ⁻ retrouvées dans les cerveaux d'animaux :	170
III.B.c.	Screening des molécules déprotonées [M-H] ⁻ retrouvées les systèmes biologiques :	172
III.B.d.	Screening des molécules déprotonées [M-H] ⁻ issus de l'oxydation des composés phénoliques :	176
III.C.	<i>Analyse des milieux basaux des cellules Bend3</i>	178
IV.	CONCLUSION	179
DISCUSSION GÉNÉRALE		181
I.	LE STRESS OXYDATIF : LE DÉSÉQUILIBRE DU SIÈCLE	182
II.	L'ÉTUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES À LA FRONTIÈRE DE LA CHIMIE ET DE LA BIOLOGIE	183
II.A.	<i>Les transferts d'électrons à l'origine de la régulation rédox :</i>	183
II.B.	<i>Les composés phénoliques en conditions de cultures cellulaires :</i>	185
II.C.	<i>Quel est le devenir des composés phénoliques dans un contexte de stress oxydatif ?</i>	187
III.	BIODISPONIBILITÉ CÉRÉBRALE	189
III.A.	<i>Passage de la BHE</i>	191

III.B. <i>Transformations métaboliques</i>	192
III.C. <i>Interaction avec les membranes</i>	193
IV. FINALEMENT, DE L'HUILE D'OLIVE OU UNE FORMULATION SPÉCIFIQUE ?	194
IV.A. <i>L'effet nutritionnel se suffit-il à lui-même ?</i>	194
IV.A. <i>Potentialiser les effets des composés phénoliques ?</i>	195
V. LIMITES DE L'ÉTUDE.....	202
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	205
ANNEXE I	208
ANNEXE II	223
ANNEXE III-A	225
ANNEXE III-B	226
ANNEXE III-C	227
ANNEXE III-D	228
ANNEXE III-E	229
ANNEXE III-F.....	229
RÉFÉRENCES.....	231

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Potentiel formel E° des couples rédox mesuré à pH 7 par rapport à l'électrode de référence ESH.....	3
Tableau 2 : Produits issus de la peroxydation des lipides dans le cerveau.....	13
Tableau 3 : Classification des facteurs de risque.....	26
Tableau 4 : Recherche des études cliniques complétées portant sur les antioxydants, et/ou les polyphénols et la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Source : clinicaltrials.gov.	37
Tableau 5 : Composition de l'huile d'olive.....	41
Tableau 6 : Études cliniques portant sur la consommation d'huile d'olive et les troubles cognitifs.....	44
Tableau 7 : Principales classes de composés phénoliques présents dans l'huile d'olive et leurs représentants principaux.	49
Tableau 8 : Capacités antioxydantes <i>in vitro</i> du tyrosol, de l'acide <i>p</i> -coumarique, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine.....	53
Tableau 9 : Classification des différents tests antioxydants en fonction du mécanisme mis en jeu.	75
Tableau 10 : Conditions de traitements des cellules SK-N-SH pour analyse des métabolites intracellulaires.	159
Tableau 11 : Gradient utilisé pour la séparation des composés présents dans les extraits intracellulaires, avant analyses par ESI-TOF-MS ²	161
Tableau 12 : Caractéristiques LC-ESI-TOF-MS ² des composés phénoliques standards utilisés dans nos conditions.....	162
Tableau 13 : Listes des composés phénoliques ayant subi des modifications de phase II recherchées.	170
Tableau 14 : Listes des masses des composés phénoliques retrouvés dans les cerveaux animaux.	172
Tableau 15 : Listes des masses des composés phénoliques retrouvés dans les systèmes biologiques autres que dans le cerveau d'animaux.	176
Tableau 16 : Produits issus de l'électrolyse des composés phénoliques individuels et du Mix 1	178
Tableau 17 : Résumé des métabolites issus de l'oxydation par voie électrochimique des composés phénoliques préalablement identifiés lors de l'utilisation d'autres méthodes d'oxydation.....	190

Tableau 18 : Métabolites des composés phénoliques de l'huile d'olive et leurs effets in vitro et in vivo.	198
Tableau 19 : Études observationnelles des diètes bénéfiques pour le maintien de la santé cognitive.....	200
Tableau 20 : Phenolic compounds found in olive oil and olive oil oxidized or process wastes.....	208
Tableau 21 : Oxidation products of oleuropein	215
Tableau 22 : Oxidation products of <i>p</i> -coumaric acid.....	217
Tableau 23 : Oxidation products of tyrosol	218
Tableau 24 : Oxidation products of hydroxytyrosol	219

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une espèce chimique stable avec une couche électronique complète et d'une espèce chimique radicalaire.....	2
Figure 2 : Réduction de l'oxygène par transfert d'électrons et de protons : formation d'espèces réactives de l'oxygène.....	3
Figure 3 : Échelle de potentiel formel à pH 7.....	3
Figure 4 : Chaîne mitochondriale de transport des électrons et production du radical anion superoxyde	7
Figure 5 : Catabolisme des monoamines par la MAO et formation de peroxyde d'hydrogène8	
Figure 6 : Sources de production du peroxyde d'hydrogène dans la cellule et en charge par les enzymes antioxydantes.	9
Figure 7 : Équilibre rédox en situation homéostasique et déséquilibre rédox en situation pathologique.	10
Figure 8 : Modifications de l'équilibre rédox en fonction du temps : distinction entre stress aigu et stress chronique.....	11
Figure 9 : Voies de signalisations activées par les EROs et expression des facteurs de transcriptions associés.....	19
Figure 10 : Progression de la MA et de la MP : les différents stades cliniques en fonctions des symptômes cliniques et les stades de Braak associés.	23
Figure 11 : Structure de base des composés phénoliques.	46
Figure 12: Classification des composés phénoliques.	46
Figure 13 : Biotransformation de l'hydroxytyrosol par les enzymes de phases II.....	60
Figure 14 : Processus d'oxydation du phénol par transfert monoélectronique et formation du radical phénoxy stabilisé par ses formes mésomères.	63
Figure 15 : Structures de composés phénoliques monohydroxylés et de leurs homologues dihydroxylés ou méthylés.	63
Figure 16 : Oxydation des catéchols et réduction des quinones, suivie d'une addition nucléophile.....	64
Figure 17 : Dismutation du radical semiquinone en quinone et catéchol.	64
Figure 18 : Formation d'EROs suite à l'auto-oxydation de la fonction catéchol.....	65
Figure 19 : Structure de l'acide protocatéchique et du catéchol.....	66
Figure 20 : Structure de l'oleuropéine avec numérotation des atomes selon (Hassanzadeh, Akhtari et al. 2014).....	66
Figure 21 : Formes mésomères des quinones.	67
Figure 22 : Addition nucléophile de type Michael	68
Figure 23 : Dimérisation de l'oleuropéine par couplage radicalaire.....	69

Figure 24 : Oxydoréduction couplée.....	70
Figure 25 : Chélation des métaux de transition par la moitié catéchol.	72
Figure 26 : Inhibition du radical par les composés phénoliques selon différents mécanismes (SET, HAT ou SPLET).	75
Figure 27: Schématisation du montage et de la réaction électrochimique à l'électrode.	78
Figure 28 : Représentation schématique de la rampe de potentiels appliqués aux bornes de l'électrode lors de la voltammétrie cyclique.	80
Figure 29 : Voltammogramme d'un système réversible (A) et d'un système irréversible (B).80	
Figure 30 : Représentation schématique de l'application du potentiel en SWV et voltammogramme caractéristique d'une espèce réversible.	81
Figure 31 : Réponse du courant au saut de potentiel en fonction du temps.	82
Figure 32 : Montage expérimental pour la spectroélectrochimie et électrode de travail en grille de platine	83
Figure 33 : Voltammogrammes de l'oxygène en milieu aprotique en l'absence ou en présence de ArOH.....	86
Figure 35 : Schéma de la culture des cellules Bend3 sur insert.	159
Figure 36 : Démarche d'analyse pour l'observation des métabolites intracellulaires issus de la modification présumée des composés phénoliques.	164
Figure 37 : Analyse de la quantité relative des composés phénoliques natifs dans les extraits intracellulaires.....	166
Figure 38 : Analyse de la quantité relative des composés phénoliques natifs dans les milieux extracellulaires.....	167
Figure 39 : Structure du Tyrosol Sulfate.....	170
Figure 40 : Aire du pic relatif à l'ion m/z 217.0182 retrouvé dans les milieux extracellulaires des expérimentations n1 traitées avec le Mix1.	170
Figure 41 : Analyse de la quantité relative de l'ion m/z 153.0561 retrouvé dans les échantillons traités avec le Mix1 :	172
Figure 42 : Hydrolyse de la liaison ester de l'oleuropéine pour former le 11-méthyl oléoside.	173
Figure 43 : Analyse de la quantité relative de l'ion m/z 403.1318 retrouvé dans les échantillons traités avec le Mix1 : A) dans les extraits intracellulaires; B) dans les milieux extracellulaires.	174
Figure 44 : Comparaison de la quantité relative de l'oleuropéine (m/z 539.1770) et du 11-méthyl-oléoside (m/z 403.1318) dans les extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitements.....	175
Figure 45 : Évaluation semi-quantitative des formes natives des composés phénoliques étudiés dans le milieu basal des cellules Bend3 après 30 et 210 min de traitement.....	179

Figure 46 : Profil LC-HRMS/MS des standards de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide <i>p</i> -coumarique.	225
Figure 47 : Comparaison des Total Ion Current (TIC) des extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitement avec les composés phénoliques 1 μ M.....	226
Figure 48 : Comparaison des Total Ion Current (TIC) des extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitement avec les composés phénoliques 1 μ M et le H ₂ O ₂ 200 μ M.	226
Figure 49 : XIC des composés phénoliques d'intérêt et du standard interne présents dans les milieux extracellulaires.	227
Figure 50 : XIC des composés phénoliques d'intérêt et du standard interne présents dans les extraits intracellulaires.....	227
Figure 51 : XIC m/z 403.1230 et spectres de masse correspondants : A) XIC du 11-méthyl-oléoside dans les extraits intracellulaires; B) XIC du 11-méthyl-oléoside dans les milieux extracellulaires.	228
Figure 52 : XIC m/z 217,0182 dans les milieux extracellulaires des expérimentations n1 et spectres de masse et de fragmentation associés correspondant à l'identification du tyrosol sulfate.	230

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet	MMSE : Mini Mental State Examination
3MS : Modified Mini-Mental State	MoCA : Montreal Cognitive Assessment
4-HNE : 4-hydroxynonéal	MP : Maladie de Parkinson
8-OHdG : 8-hydroxydéoxyguanosine	MPP ⁺ : 1-méthyl-4-phényl pyridinium
8-OHG : 8-hydroxyguanosine	MVB : Corps multivésiculaires
AAPH : 2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride	NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique)	NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde-bêta	NOX : NADPH oxydase
ATP : Adénosine triphosphate	NO : Oxyde nitrite
A β : Amyloïde-bêta	NOO \cdot : Peroxynitrite
BHE : Barrière hématoencéphalique	NOS : NO synthases
CAT : Catalase	Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
COX: Cyclooxygénases	O $_2^{\cdot-}$: Anion superoxyde
DNF : Dégénérescences neurofibrillaires	OH \cdot : Radical hydroxyle
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	OMS : Organisation mondiale de la santé
E $^{\circ}$: Potentiel standard d'oxydoréduction	ONOO \cdot : Anion peroxynitrite
ERN : Espèce réactives de l'azote	ORAC : Oxygen radical absorbance capacity
ENH : Électrode normale à hydrogène	PRX : Peroxiredoxine
ERO : Espèces réactives de l'oxygène (<i>ROS – reactive oxygen species</i>)	PSEN1 : Préséniline 1
FRAP : Ferric reducing antioxidant power	PSEN2 : Préséniline 2
GPX : Glutathion peroxydase	pTau : Protéine Tau hyperphosphorylée
GR : Glutathion réductase	ERN : Espèces réactives de l'azote (<i>RNS - Reactive Nitrogen Species</i>)
GRX : Glutarédoxine	ROO : Radicaux peroxydes
GSH : Glutathion réduit	ROOH : Peroxydes
GSSG : Glutathion-disulfure (oxydée)	SET : Sequential electron transfer
GST : Glutathion S-transferase	SNpc : <i>Substantia Nigra pars compacta</i>
H $_2$ O : Eau	SOD : Superoxyde dismutase
H $_2$ O $_2$: Peroxyde d'hydrogène	TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity
HAT : Hydrogen atom transfer	TRAP : Total radical-trapping antioxidant parameter
HO \cdot : Radical hydroxyle	TRX : Thioredoxine
HO $_2^{\cdot}$: Radical hydroperoxyde	
LOO \cdot : Radical peroxyde	
LOX : Lipooxygénase	
MA : Maladie d'Alzheimer	
MDA : Malondialdéhyde	

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

I. Le stress oxydatif ou déséquilibre de l'état redox

La première partie de ce chapitre vise à rappeler les fondements des processus d'oxydation à l'échelle cellulaire, ainsi que leurs impacts délétères. Les espèces chimiques qui entrent en jeu seront abordées, puis la définition du stress oxydatif sera détaillée. Enfin, les conséquences cellulaires et les moyens de défense seront décrits.

I.A. Les espèces réactives de l'oxygène

I.A.a. Généralités

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe, aussi appelée couche électronique ou couche de valence (Figure 1). Ces électrons célibataires sont généralement issus de ruptures de liaisons et confèrent une grande instabilité à ces espèces chimiques. La stabilité chimique se définit par une stabilité thermodynamique qui reflète l'état d'énergie de la molécule. Plus le niveau d'énergie est bas, plus l'espèce est stable, donc en équilibre et inversement plus l'énergie augmente plus l'instabilité augmente. Plus l'instabilité est grande, plus l'électron libre est capable d'être transféré à une autre espèce : c'est le caractère radicalaire.

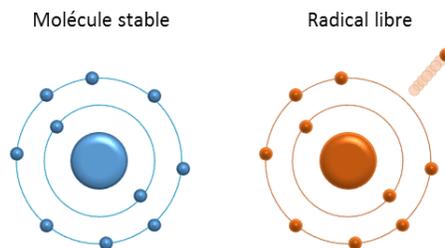


Figure 1 : Représentation schématique d'une espèce chimique stable avec une couche électronique complète et d'une espèce chimique radicalaire.

Les EROs (Espèces Réactives de l'Oxygène – ROS : *reactive oxygen species*) sont en majorité des espèces radicalaires, mais il existe également des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette dernière est classée dans les espèces réactives de l'oxygène, car elle peut produire des radicaux oxygénés.

L' O_2 est une molécule biradicalaire qui possède deux atomes d'oxygène, eux-mêmes possédant chacun un électron non apparié sur leur orbitale externe. Ces deux électrons célibataires de spin parallèle permettent à O_2 de capter un électron ce qui entraîne sa réduction partielle en radical

anion superoxyde. La capture d'un second électron, et de deux protons, entraîne la formation du H₂O₂ alors que sa réduction à trois électrons entraîne la formation d'HO• (Figure 2).

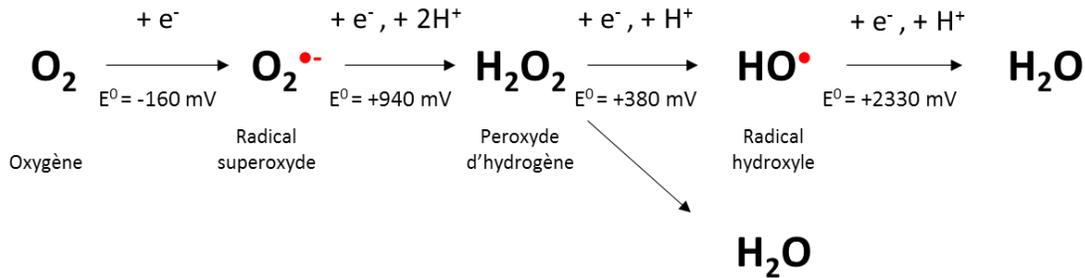


Figure 2 : Réduction de l'oxygène par transfert d'électrons et de protons : formation d'espèces réactives de l'oxygène.

E_p^0 vs ESH (Électrode Standard à Hydrogène).

Adaptée de (Giorgio, Trinei et al. 2007) et (Mohammad, Khan et al. 2001).

Comme décrit dans le paragraphe ci-dessus et dans la Figure 2, la formation des EROs se fait par transfert d'électrons par l'intermédiaire de réactions d'oxydoréduction. Ces réactions mettent en jeu des couples oxydant/réducteur, chacun ayant une valeur de potentiel standard E^0 . Cette valeur, exprimée en volt (V), est mesurée par rapport à une électrode standard à hydrogène (ESH) dans les conditions standards. Dans la pratique, c'est le potentiel formel E'^0 qui est utilisé pour prévoir la réactivité des espèces chimiques. Plus ce potentiel est élevé, plus l'oxydant du couple oxydoréducteur est fort (plus il attire le(s) électron(s)) (Tableau 1 et Figure 3).

Tableau 1 : Potentiel formel E'^0 des couples rédox mesuré à pH 7 par rapport à l'électrode de référence ESH.

Tableau adapté de (Gardès-Albert 2006)

Couple Ox / Red	Nombre d'électrons	E'^0 (Volt)
$\text{OH}^\bullet / \text{H}_2\text{O}$	1	2.34
$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	2	1.34
$\text{O}_2^{\bullet -} / \text{H}_2\text{O}_2$	1	0.93
$\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	4	0.81
$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	1	0.3
$\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}_2$	2	0.3
$\text{O}_2 / \text{O}_2^{\bullet -}$	1	-0.33

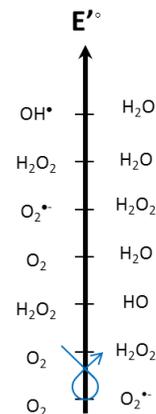


Figure 3 : Échelle de potentiel formel à pH 7

I.A.b. Le radical anion superoxyde

Ce radical est le premier formé par réduction monoélectrique de l'oxygène (Eq. 1) principalement au cours de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Sa physico-chimie est complexe. D'une part $O_2^{\cdot-}$ est un réducteur dans le couple $O_2/O_2^{\cdot-}$ qui a un potentiel formel de - 0.33 V et peut donc être oxydé par tout oxydant ayant un potentiel standard supérieur (Figure 3 Eq 1). D'autre part, c'est un oxydant dans le couple rédox $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$. En milieu aqueux, le potentiel formel E° du couple $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ étant supérieur au potentiel formel du couple $O_2/O_2^{\cdot-}$ la réaction de dismutation du superoxyde est thermodynamiquement favorisée (Eq 2). En présence d'eau, ce radical anion peut aussi former un radical hydroperoxyde HO_2^{\cdot} par transfert d'un proton H^+ (Eq 3). Bien que ce radical soit beaucoup plus réactif qu' $O_2^{\cdot-}$, sa quantité est très faible à pH physiologique. D'autre part, l'anion superoxyde est une base et est donc susceptible de réagir avec un composé qui présente une fonction acide.

Cependant, $O_2^{\cdot-}$ réagit peu avec les macromolécules constitutives des cellules vivantes (protéines, lipides et acides nucléiques), non pas à cause de son potentiel rédox qui n'est pas si bas, mais plutôt à cause de cinétiques de réactions lentes (Bielski and Richter 1977) et donc sa demi-vie plus importante que celle des autres radicaux (10^{-6} sec)(Forkink, Smeitink et al. 2010). Seuls les groupements thiols accessibles de certaines protéines et certains sucres sont ses cibles directes, formant alors des dérivés dicarboxylés réactifs (Okado-Matsumoto and Fridovich 2000, Imlay 2003).

Sa toxicité vient principalement de son statut d'initiateur de réactions en chaîne menant à l'apparition d'autres composés hautement réactifs tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle HO^{\cdot} (Eq 2 à Eq 6) ou encore le peroxydinitrite $ONOO^{\cdot-}$.

Par ailleurs, il a été démontré que l' $O_2^{\cdot-}$ induisait une augmentation de fer libre dans la cellule suite à l'oxydation des protéines séquestrant le fer comme la ferritine, et par conséquent favorise la production d' HO^{\cdot} et la peroxydation lipidique (Keyer and Imlay 1996).



Réaction d'Haber-Weiss



Réaction de Fenton



I.A.c. Le peroxyde d'hydrogène

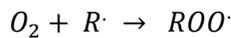
Le H_2O_2 n'est pas une espèce radicalaire, mais est un oxydant fort, dû à son potentiel d'oxydation élevé à pH 7 (Tableau 1). Cependant, cet EROs réagit peu avec les macromolécules cellulaires. Sa toxicité provient principalement de la réaction de Fenton, qui fait interagir le fer ou le cuivre bivalents (Fe^{2+} ou Cu^{2+}) et le H_2O_2 pour produire le radical HO^{\cdot} (Eq 5). Bien que cette réaction puisse s'épuiser rapidement en raison de la consommation du fer ferreux, la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} par $O_2^{\cdot-}$ selon la réaction d'Haber-Weiss (Eq 4) entraîne une réaction de Fenton continue tant que la production d' $O_2^{\cdot-}$ est maintenue.

I.A.d. Les autres EROs secondaires

Le radical hydroxyle HO^{\cdot} : ce radical est formé suite à la réactivité entre H_2O_2 et Fe^{2+} ou entre H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$ (Eq 5 et Eq 6). Les radicaux hydroxyles sont des espèces oxydatives puissantes d'une part, car leur potentiel standard d'oxydoréduction est élevé (Figure 3), d'autre part car elle présente une cinétique de réaction rapide avec les macromolécules (de l'ordre de la nanoseconde, 10^{-9} sec). Cela lui permet de réagir avec un substrat organique dès le premier contact sans apport extérieur d'énergie. Sa diffusion limitée lui permet de réagir avec des substrats organiques très proches (acides nucléiques, protéines et lipides), causant de multiples dommages cellulaires en faisant l'un des EROs les plus nocifs dans le monde vivant.

Le radical peroxy ROO^{\cdot} : Les radicaux de type peroxy- sont caractérisés comme des radicaux secondaires issus de la réaction entre l' O_2 et des sites radicalaires carbonés R^{\cdot} formés suite aux attaques du radical OH^{\cdot} sur les macromolécules (Eq 7). Leur vitesse de réaction est moins importante que celle des radicaux hydroxyles (de l'ordre de 10^2 à 10^8 mol⁻¹.L.s⁻¹) (Gardès-Albert

2006), mais ils n'en restent pas moins dommageables pour les macromolécules. Ils entraînent notamment la propagation en chaîne des dommages radicalaires lors de la peroxydation des lipides par l'arrachement d'un atome d'hydrogène.



Eq 7

Les radicaux azotés : ils sont issus de processus enzymatiques et de réactions avec les ROS. Le monoxyde d'azote radicalaire $^{\cdot}\text{NO}$ et le peroxyntrite ONOO^\cdot sont issus de la réaction enzymatique des NO synthases (NOS). Ces radicaux physiologiques possèdent, comme les ROS, des effets délétères lorsqu'ils sont produits en quantité trop importante pour les défenses antioxydantes, créant alors un stress nitrosatif par S-nitrosylation des macromolécules, ce qui va amplifier le stress oxydatif (Massion, Preiser et al. 2002).

Les espèces radicalaires possèdent des demi-vies relativement courtes (de l'ordre de 10^{-4} sec) (Beaudeau, Peynet et al. 2006). Cette instabilité est à l'origine de réactions en chaîne pouvant provoquer de nombreux dégâts dans un contexte cellulaire. Cependant, ces réactions peuvent être stoppées de deux façons :

- Par recombinaison entre radicaux : ces réactions biradicalaires sont possibles uniquement s'il s'agit de chaînes organiques saturées.
- Par action d'un système antioxydant (enzymatique ou non enzymatique).

I.B. Les sources de radicaux

La production d'EROS est un processus physiologique, il existe donc une machinerie complexe créatrice de ROS. Mais ils peuvent aussi être produits en réponse à un facteur environnemental.

I.B.a. Endogènes

Sources mitochondriales

La réduction de l' O_2 en H_2O à travers la chaîne de transport des électrons génère une fuite d'électrons, principalement au niveau des complexes 1 et 3 de la chaîne respiratoire (Figure 4). L'importance de l'activité mitochondriale dans les cellules en fait la source principale de production d'EROS à travers la production de radical superoxyde avec en moyenne $3 \cdot 10^{17}$ O_2^\cdot libéré par

cellule et par jour. La production d' $O_2^{\bullet-}$ génère la production de H_2O_2 à travers la transformation du radical superoxyde par les superoxydes dismutases (SOD).

Une seconde source importante de génération d'EROS est l'enzyme NADPH oxydase (NOX) membranaire. Son rôle est de catalyser la réduction monoélectrique de l'oxygène en présence de H^+ et en utilisant le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme cofacteur donneur de protons. Tout comme pour le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale, son activité entraîne la production secondaire d' $O_2^{\bullet-}$. Elle est plus active dans les macrophages activés que dans les cellules non phagocytaires où son activation est tardive (DeCoursey and Ligeti 2005).

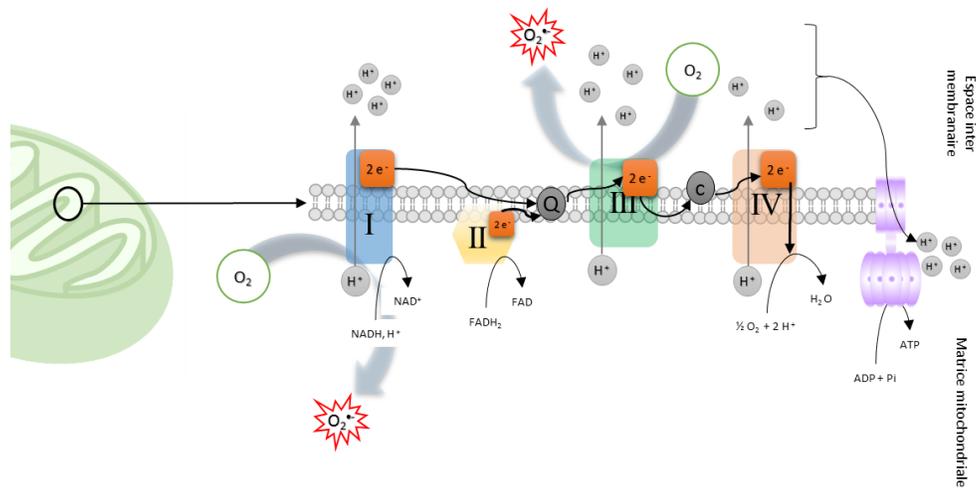


Figure 4 : Chaîne mitochondriale de transport des électrons et production du radical anion superoxyde
 NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; Q : Coenzyme Q₁₀ (ubiquinol) ; FAD : Flavine adénine dinucléotide ; ATP : Adénosine triphosphate ; ADP : Adénosine diphosphate ; I : complexe I (NADH déshydrogénase) ; II : complexe II (succinate déshydrogénase) ; III : complexe III (ETF – electron-transferring flavoproteins- déshydrogénase) ; IV : complexe IV (coenzyme Q-cytochrome c réductase).

Les monoamines oxydases (MAO)

Les MAO sont des enzymes ubiquitaires particulièrement abondantes dans le foie et dans le cerveau permettant la désamination oxydative des amines endogènes (principalement les neurotransmetteurs noradrénaline, sérotonine et dopamine) ou exogènes (Dale 2014). Ces oxydoréductases utilisent le FAD et l'oxygène comme co-facteurs ce qui a pour conséquence une production importante de H_2O_2 (Figure 5). Les MAO sont présentent sur la membrane externe des mitochondries et représentent une source de stress oxydatif importante, notamment dans le cas de la Maladie de Parkinson (MP), particulièrement affectée par la dégradation de la dopamine

(Mallajosyula, Kaur et al. 2008). En effet, la prise en charge de la dopamine cytoplasmique par la MAO est un mécanisme de protection pour éviter son oxydation en sa forme quinone qui conduit finalement à la formation de l'aminochrome réactif (Ci, Frisch et al. 2006). Cependant, la transformation de la dopamine libre par la MAO entraîne la formation, en plus du H_2O_2 , du 3,4-dihydrophenylacetaldehyde (DOPAL) lui aussi réactif. Il sera pris en charge par différentes enzymes pour limiter son impact délétère (Berman and Hastings 1999).

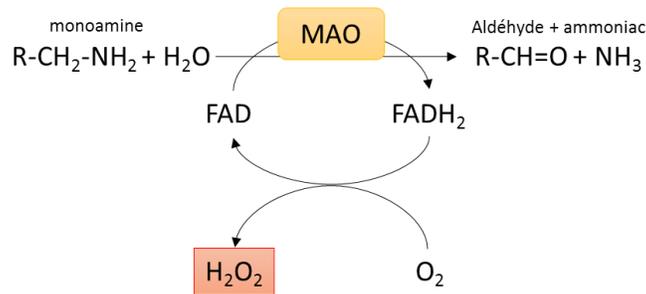


Figure 5 : Catabolisme des monoamines par la MAO et formation de peroxyde d'hydrogène
Adapté de (Hauptmann, Grimsby et al. 1996).

Autres sources de production

D'autres sources d'EROS existent à l'intérieur des cellules (Figure 6). C'est le cas du système xanthine oxydase qui est aussi impliqué dans la production d' O_2^{\bullet} par réduction de l'oxygène, des enzymes de la famille des cytochromes P450 oxydases impliquées dans le métabolisme endogène, mais aussi dans le métabolisme des xénobiotiques. Elles assurent l'oxydation nécessaire à l'élimination de certaines molécules. Leur mécanisme génère O_2^{\bullet} et du H_2O_2 . Le fonctionnement du peroxysome, un organite contenant plusieurs enzymes d'oxydoréduction, utilise aussi de l'oxygène et est, de ce fait, une source de production de H_2O_2 . Les lipoxygénases impliquées dans l'oxydation des acides gras insaturés génèrent du H_2O_2 , tout comme les cyclooxygénases. Ces deux classes d'enzymes sont particulièrement impliquées dans les processus inflammatoires (Giorgio, Trinei et al. 2007, Martinez-Revelles, Avendano et al. 2013). Enfin, il peut être souligné que le H_2O_2 n'est pas une molécule chargée, ce qui lui permet de diffuser passivement entre les tissus (Winterbourn 2013). Cette espèce peut donc avoir une action biologique à un site potentiellement éloigné de son lieu de production.

I.B.b. Exogènes

L'environnement joue un rôle déterminant dans la production de ROS. L'exposition aux UV elle-même, donc aux rayons lumineux du soleil, est génératrice d' O_2^{\bullet} de radicaux OH^{\bullet} et de H_2O_2 . De plus, les différents polluants auxquels est confronté l'organisme seront éliminés à travers des mécanismes de détoxification impliquant la production de ROS. L'ingestion d'alcool active le système xanthine oxydase, une aldéhyde oxydase, le système NOX et des cytochromes P450 afin d'éliminer l'éthanol. Plusieurs toxines présentes dans l'environnement immédiat contiennent de l'oxyde d'azote et du dioxyde d'azote qui vont générer des EROs et des radicaux de l'azote. Ces produits sont retrouvés dans le tabac, le charbon, la suie, ainsi que dans certains polluants issus de l'industrie.

La multitude de voies impliquées dans la production des EROs peut très vite générer de larges quantités d'EROS susceptibles d'oxyder les macromolécules cellulaires et de détériorer leurs actions. C'est pourquoi il existe des systèmes de défense endogènes capables de stopper le caractère radicalaire de ces espèces réactives.

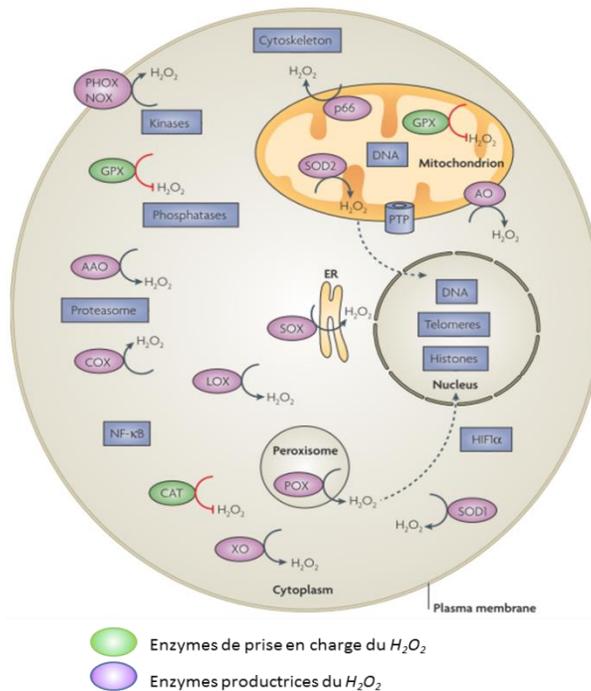


Figure 6 : Sources de production du peroxyde d'hydrogène dans la cellule et en charge par les enzymes antioxydantes.

(PHOX) : oxydases phagocytaires; (NOX) : NADP/H oxydases; (SOD) superoxydes dismutases; (p66) p66 shc; (AO) amines oxydase; (POX) : oxydases peroxysomales; (SOX) sulphydryle oxydase; (AAO) : amino-acide

oxydases; (COX) cyclooxygenase; (LOX) : lipides oxygenase; (XO) xanthine oxydase; (GPX) : glutathion peroxydase; (CAT) : catalase; (eR) : reticulum endoplasmique. Adapté de (Giorgio, Trinei et al. 2007).

I.C. Définition du stress oxydatif

Dans les systèmes aérobies, l'oxygène O_2 est la source principale de production d'énergie. Il joue le rôle d'accepteur final des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, au niveau de la membrane interne. La principale source de production d'ATP (adénosine triphosphate) nécessaire à la survie des cellules et plus largement des organismes, implique le transfert de quatre électrons à l' O_2 pour former une molécule d'eau H_2O

En conditions physiologiques, 1 à 2% de l' O_2 n'est que partiellement réduit. Il y a alors formation d'espèces réactives avec un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe, d'où leur nom, les espèces réactives de l'oxygène. Afin de se stabiliser, elles vont naturellement chercher à réagir avec d'autres molécules pour compléter leur couche de valence.

En conditions physiologiques, il existe un équilibre naturel entre la production d'EROs et leur prise en charge par les systèmes de défenses antioxydantes de l'organisme. Cependant, lors d'un état pathologique, une augmentation de la production de ces espèces réactives peut être observée. Lorsque la production d'EROs dépasse les capacités cellulaires antioxydantes, ces espèces réactives vont réagir avec les premières molécules à leur disposition. Il y a une dérégulation de l'état rédox des cellules et des dommages oxydatifs souvent irréversibles apparaissent ensuite au niveau des macromolécules biologiques (Figure 7).

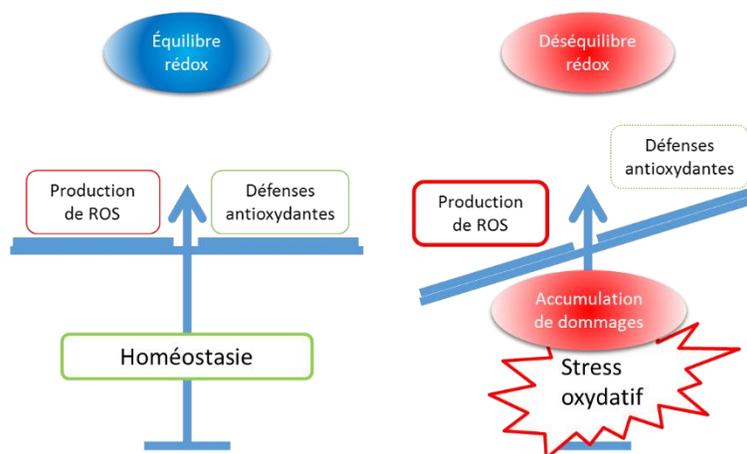


Figure 7 : Équilibre redox en situation homéostatique et déséquilibre redox en situation pathologique.

Le stress oxydatif résulte d'une accumulation des dommages oxydatifs due à une incapacité de l'organisme à se défendre contre les attaques des ROS. Ce peut être dû soit à une surproduction de ROS, soit à une diminution des défenses antioxydantes. Ce déséquilibre peut survenir sur une courte échelle de temps, on parle alors de stress aigu, et se termine par un retour à l'équilibre redox. Cependant, quand le stress oxydatif perdure dans le temps, l'organisme ne parvient pas à rééquilibrer le statut redox. C'est l'apparition du stress oxydatif chronique, ou pathologique (Figure 8). Cet état est le plus délétère pour l'organisme et entraîne le vieillissement prématuré des tissus.

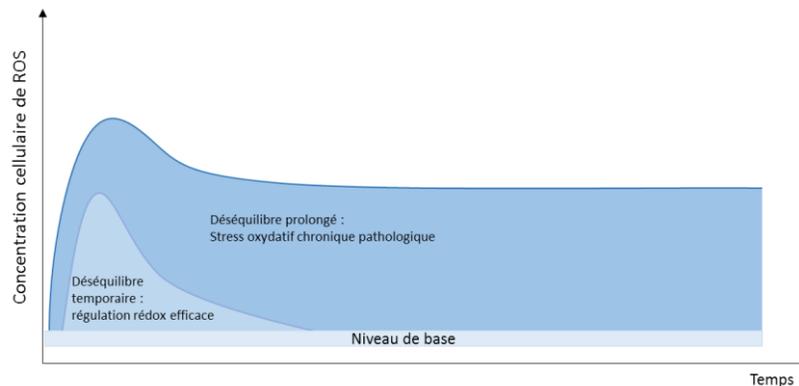


Figure 8 : Modifications de l'équilibre redox en fonction du temps : distinction entre stress aigu et stress chronique.

Adapté de (Lushchak 2014)

I.D. Les modifications oxydatives des macromolécules cellulaires

Les EROs réagissent avec les molécules présentes dans leur environnement plus ou moins proche en fonction des espèces et produisent des dommages importants au niveau des macromolécules cellulaires.

I.D.a. Oxydation des protéines :

Tous les radicaux peuvent oxyder des protéines, mais le radical hydroxyle HO^\bullet est le plus réactif (Headlam and Davies 2004). Cette voie d'oxydation des protéines est communément appelée « metal-catalysed oxidation » (MCO) et entraînera préférentiellement la carbonylation des acides aminés aromatiques tels que le tryptophane ou la tyrosine.

L'oxydation primaire des protéines entraîne soit la rupture de liaisons peptidiques, soit la carbonylation de la chaîne latérale de certains acides aminés. Cette réaction, qualifiée de modification post-traductionnelle irréversible, fait apparaître une moitié carbonyle réactive sur les chaînes latérales des protéines, tels que des aldéhydes ou des cétones.

Les protéines peuvent aussi être oxydées par des voies dites secondaires qui impliquent des composés issus du métabolisme oxydatif. Plusieurs de ces résidus sont des composés fortement électrophiles capables de réagir avec des groupes nucléophiles tels que les chaînes latérales des lysines, histidines et cystéines pour former des bases de Schiff ou des adduits de Michael. C'est notamment le cas de l'acroléine, du malondialdéhyde (MDA) ou encore du 4-hydroxynonéal (4-HNE). Les produits avancés/terminaux de glycation sont aussi capables d'induire l'oxydation des protéines. En effet, ces produits contiennent des moitiés carbonyles réactives comme le glyoxal ou encore le méthylglyoxal qui peuvent modifier les résidus basiques comme l'arginine ou la lysine (Augustyniak, Adam et al. 2015).

Que ce soit par la rupture de liaisons peptidiques ou par la carbonylation directe ou indirecte, l'oxydation des protéines mène à une perte de fonction, augmente leur agrégation, altère la membrane plasmique et le potentiel rédox de la cellule. De plus, il y a génération de sous-produits oxydés. Par exemple, une augmentation des résidus oxydés de tryptophane a été montrée chez des rats soumis à un stress oxydatif aigu (Augustyniak, Adam et al. 2015). Ces sous-produits sont eux-mêmes capables de modifier le profil d'expression des protéines (Augustyniak, Adam et al. 2015).

I.D.b. Peroxydation lipidique :

Parmi les radicaux préalablement cités, le radical hydroperoxyde HO_2^\bullet et le radical hydroxyle HO^\bullet sont les plus réactifs vis-à-vis des lipides à potentiel rédox inférieur. Le processus d'oxydation des lipides se fait en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

La première étape nécessaire est l'abstraction d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras insaturé (Eq 8). Le radical alkyle L^\bullet formé (chaîne carbonée ayant perdu un hydrogène) réagit rapidement avec l' O_2 pour former un radical peroxyde LOO^\bullet (Eq 9). Il y a alors transfert d'un atome d'hydrogène à une autre molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes (Eq 10). C'est l'étape de propagation. L'acide gras oxydé se transforme en radical alkyle et le cycle recommence. Après plusieurs cycles de peroxydation, les radicaux produits peuvent réagir entre eux et former des produits non radicalaires, notamment par dimérisation des radicaux (Eq 11-13) : c'est l'étape de terminaison.

Certains composés antioxydants peuvent intervenir durant la peroxydation et stopper la réaction en chaîne en piégeant les radicaux peroxydes réactifs (Eq 14). Plusieurs composés endogènes et exogènes disposent de cette propriété de stopper la réaction ou de « chain breaking ».

Outre la déstructuration des lipides constitutifs des parois cellulaires, la peroxydation lipidique entraîne la formation de plusieurs composés secondaires réactifs. Le MDA et le 4-HNE en font partie, ainsi que l'acroléine (Tableau 2). Ces produits peuvent être considérés comme des messagers secondaires du stress oxydatif puisqu'ils vont continuer à altérer les macromolécules cellulaires comme les protéines ou l'ADN en formant des adduits. L'équipe du Pr. C. Ramassamy a d'ailleurs démontré la toxicité importante de l'acroléine *in vitro* et *in vivo*. Cette toxicité est générée par une diminution importante des antioxydants endogènes (Dang, Arseneault et al. 2010, Dang, Arseneault et al. 2010, Singh, Dang et al. 2010).

Initiation



Propagation

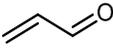


Terminaison



Tableau 2 : Produits issus de la peroxydation des lipides dans le cerveau.

Adapté de (Singh, Dang et al. 2010)

Hydroxy-alkenals	Isoprostanes	Neuroprostanes	Acroléine
HNE issu de l'acide arachidonique ou linoléique	Issu de l'acide arachidonique : F2 IsoPs (64 isomères). Issu de l'acide linoléique : F3 IsoPs	Issus de l'acide docosashexaénoïque : F4 IsoPs	

I.D.c. Oxydation des acides nucléiques :

L'acide 2'-désoxyribonucléique (ADN) contient toute l'information génétique des cellules. Les bases puriques et pyrimidiques sont toutes liées à un sucre, le 2-désoxyribose qui les relie entre elles par des liaisons de type phosphodiester. Les deux brins de l'ADN sont liés entre eux par des liaisons hydrogène. La modification ou l'altération de cette structure complexe est impliquée dans les processus de vieillissement, de mutagenèse et de mort des cellules.

Les altérations oxydatives de l'ADN peuvent être des cassures simples ou doubles brins par abstraction d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose, mais aussi l'oxydation des bases qui conduisent à des alkylations et à des réarrangements. Des adduits peuvent se créer entre les bases aminées et les aldéhydes réactifs issus de réactions d'oxydation comme le MDA ou le 4-HNE, et des liaisons entre bases azotées et acides aminés peuvent entraîner des pontages ADN-protéines (Youdim, Qaiser et al. 2004). Une des lésions les plus connues est la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua).

I.E. Les systèmes de défenses antioxydantes

Les EROs sont des messagers cellulaires qui transmettent l'information à travers une modification oxydative d'autres composés cellulaires. Par exemple, la production de H₂O₂, qui n'est pas un radical, est indispensable à la différenciation des cellules souches de l'hippocampe, ou encore la production d'oxyde nitrite (NO) augmente de manière réversible la signalisation synaptique (Dickinson, Peltier et al. 2010). Les EROs sont aussi indispensables dans les processus physiologiques tels que la phagocytose, l'autophagie ou encore l'immunité (Garbarino, Orr et al. 2015).

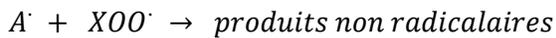
Cependant, comme décrit dans les paragraphes précédents, leur accumulation est délétère. En effet, l'altération des macromolécules cellulaires entraîne un dysfonctionnement de la fonction de ces molécules, qui mène à une dysfonction du métabolisme cellulaire dans son ensemble. C'est pourquoi il existe des défenses cellulaires pour inhiber le pouvoir oxydatif des ROS.

I.E.a. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est « une substance qui s'oppose à l'oxydation ou inhibe les réactions induites par l'oxygène et les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote » (Prior, Wu et al. 2005). Cette définition laisse place à l'existence de différents mécanismes pour lutter contre le stress oxydatif.

Un antioxydant peut agir à plusieurs niveaux : il peut agir en réduisant ou en dismutant les ROS, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les ions métalliques ou encore en modulant l'expression des gènes afin d'augmenter la synthèse des enzymes de détoxification. Ces moyens de défense se classent en différentes catégories : d'une part les défenses non enzymatiques endogènes ou exogènes et les défenses enzymatiques.

Les antioxydants dits primaires sont des composés qui interrompent la réaction radicalaire en cédant des électrons (Eq 15) ou un atome d'hydrogène. Ils sont caractérisés d'antioxydants si l'espèce formée est plus stable que le radical initial (Eq 16).



Les antioxydants dits secondaires sont des composés qui préviennent la formation de ROS. Ces propriétés peuvent se traduire par une capacité à décomposer les hydroperoxydes comme le H₂O₂ ou les produits de peroxydation lipidique empêchant ainsi la formation d'espèces radicalaires instables. La chélation des métaux de transition est aussi une propriété antioxydante en inhibant les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss.

I.E.b. Les antioxydants directs

Pour l'ensemble des EROs, et particulièrement pour les espèces radicalaires non prises en charge par les systèmes enzymatiques tels que le radical OH[•], le radical peroxyde (ROO[•]), ou l'anion peroxydinitrite (ONOO^{•-}), le maintien de l'homéostasie rédox repose sur une variété d'antioxydants. Ces composés peuvent être d'origine endogène comme c'est le cas pour le glutathion réduit (GSH), la thioredoxine (Trx-SH₂), le co-enzyme Q ou encore la bilirubine, mais aussi d'origine exogène telles que les vitamines C, E ou A.

I.E.c. Les enzymes de défenses antioxydantes

Certaines enzymes sont spécifiques à la prise en charge des EROs. C'est le cas des SOD (superoxyde dismutase) qui catalysent la dismutation du radical O₂^{•-} en H₂O₂ ou encore de la catalase qui transforme le H₂O₂ en eau et en oxygène moléculaire.

Les SOD : ce sont des métalloenzymes dont le fonctionnement se base sur l'oxydation puis la réduction du métal de transition par le radical O_2^{\bullet} pour produire de l'oxygène et de l'eau. Il existe trois isoformes des SOD, chacune possède une localisation cellulaire spécifique et fonctionne avec un ion métallique particulier. La SOD1, ou SOD à zinc et cuivre a besoin du Zn^{2+} pour être stabilisée, mais son activité catalytique fait appelle au Cu^{2+} . Cette SOD est localisée dans le cytoplasme cellulaire de tous les tissus, mais son activité est plus importante dans certains organes comme le foie ou les neurones. La SOD2 (ou Mn-SOD) est localisée dans la membrane interne de la mitochondrie où elle peut directement agir sur les radicaux O_2^{\bullet} produits au cours de la phosphorylation oxydative. La SOD3 se situe principalement dans les matrices extracellulaires et en plus faible proportion dans les liquides extracellulaires. Les SOD sont des enzymes indispensables à la survie des organismes, comme en témoignent les souris déficientes en SOD2. Ces souris ne sont pas viables au-delà d'une semaine et présentent un phénotype complexe résultant d'une déficience mitochondriale et d'un haut niveau de stress oxydatif (Melov, Adlard et al. 2007).

La catalase : la transformation *du* H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire a lieu principalement dans les lysosomes et les peroxysomes, des compartiments cellulaires dédiés à la dégradation et au recyclage des molécules intracellulaires altérées ou inutiles. Les catalases possèdent un atome de fer Fe^{3+} dans chaque sous-unité de son site catalytique (4 sous-unités en tout). Cette enzyme est « protégée » de l'action oxydative du H_2O_2 grâce à des molécules de NADPH qui sont liées à chacune des sous-unités.

Il existe d'autres enzymes qui prennent en charge les EROs et participent activement à leur détoxification à travers l'intermédiaire de composés réducteurs. C'est notamment le cas des enzymes dites oxydoréductases comme les peroxydases ou les réductases. Parmi ces enzymes, les glutathion peroxydases (GPx) utilisent le glutathion sous forme réduite (GSH) comme donneur d'électrons. L'acide aminé cystéine, avec un groupement $-SH$, lui confère un pouvoir réducteur et lui permet de réagir avec le H_2O_2 pour former de l'eau. La forme oxydée du GSH (GSSG) peut être réduite grâce à la glutathion réductase (GR) avec le NADPH comme cofacteur.

Le système thiorédoxine ($Trx-SH_2$) est aussi un système de défense très efficace. C'est le système responsable du maintien des protéines à l'état réduit à l'intérieur des cellules. Il permet d'éviter la formation de ponts disulfures après l'oxydation des acides aminés contenant des groupes thiols (SH). Tout comme pour le GSH, suite à son oxydation (sous forme de $Trx-S_2$), une réductase avec la NADPH comme cofacteur permet son retour sous forme réduite.

La localisation cellulaire et tissulaire des enzymes antioxydantes évoque un contrôle local des EROs finement régulé, associé à une prise en charge plus large pour inhiber les EROs capables de diffuser à travers les compartiments cellulaires et subcellulaires comme le H₂O₂ ou l'O₂[•].

I.E.d. Facteurs de régulations de l'état rédox

L'adaptation cellulaire en réponse à l'environnement peut se faire grâce à un ensemble d'enzymes antioxydantes et de facteurs de transcription très conservés. Concernant le stress oxydatif, les EROs sont capables de moduler certaines protéines kinases en induisant une phosphorylation au niveau des tyrosines. D'autre part, les cystéines sont reconnues comme étant particulièrement sensible à l'oxydation par les EROs, liée à la présence de leurs groupes thiols. Ces modulations peuvent réguler des signalisations cellulaires, par exemple la voie Nrf2/ Keap1 en oxydant des cystéines de Keap1. Par ailleurs, il a été démontré que certains facteurs de transcription comme NF-κB peuvent directement être activés par les EROs (Figure 9) (Leonarduzzi, Sottero et al. 2010).

La voie Nrf2-Keap1 :

La voie de régulation du facteur de transcription Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) est reconnue pour être impliquée dans la réponse au changement d'état rédox des cellules. Bien qu'exprimée de manière ubiquitaire dans tous les tissus de l'organisme, elle joue un rôle primordial dans certains organes, dont le foie et le cerveau (Yang, Jiang et al. 2015). Nrf2 est une protéine appartenant à la famille des protéines basiques « Leucine-zipper ». Elle s'hétérodimérise avec les facteurs Maf ou Jun dans le noyau. Cet hétérodimère se lie de manière spécifique aux ARE (Antioxidant Response Elements) et active les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Nrf2 est le principal régulateur de l'expression des gènes de phase II cytoprotecteurs (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al. 2002). Cette classe de gènes regroupe notamment les gènes codant pour l'expression des enzymes de détoxification comme la SOD1, la catalase, l'hème-oxygénase 1, la thioredoxine, la glutathion peroxydase (Gpx), la glutathion réductase (GR), la γ-glutamine cystéine ligase, la γ-glutamine cystéine synthase (γ-GCS) et la glutarédoxine (Grx) (Gan and Johnson 2014).

La protéine Keap1 (Kelch-like ACH-associated protéin) est un acteur principal dans la régulation de la translocation de Nrf2. En conditions normales, le facteur Nrf2 est présent dans le cytoplasme de manière constitutive, mais séquestré par Keap1. Le principe du système Nrf2-Keap1 est de conserver un niveau basal du facteur Nrf2 dans la cellule. Keap1 joue le rôle d'un adaptateur pour une E3-ubiquitine-ligase qui permet la dégradation de Nrf2 par le protéasome. C'est une protéine homo-dimérique qui contient plusieurs cystéines entourées d'autres acides aminés basiques. Cette configuration diminue le pKa des groupes thiols et augmente leur sensibilité vis-à-vis des attaques oxydatives / électrophiles (Dinkova-Kostova, Kostov et al. 2017). Ainsi, en présence d'oxydants, les groupements thiols de Keap1 vont être oxydés, créant un pont disulfure et sa dissociation du facteur Nrf2. Nrf2 n'est plus adressé vers le protéasome et ses sites de phosphorylation sont accessibles par les kinases. La protéine kinase C (PKC) est la kinase majoritairement impliquée dans la phosphorylation de Nrf2 sur la Ser40 (Bloom and Jaiswal 2003), entraînant la signalisation pour sa translocation nucléaire. D'autres protéines kinases comme CK2, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) ou encore JNK (c-Jun N-terminal kinase) et ERK (extracellular regulated kinase) se sont révélées capables de phosphoryler Nrf2, mais de manière indirecte.

Lors d'un stress, la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 peut se faire selon différents procédés : la présence d'oxydants ou d'électrophiles peut entraîner l'oxydation de cystéines de Keap1 et déstabiliser le complexe, empêchant Keap1 de jouer son rôle d'adaptateur pour l'ubiquitination de Nrf2 ; ou la phosphorylation directe de Nrf2 par des kinases activées entraîne sa dissociation de Keap1 (Vauzour, Corona et al. 2010, Lushchak 2012).

L'importance de ce facteur dans la régulation et l'expression des défenses oxydatives en fait un facteur cible prioritaire pour limiter l'oxydation cellulaire, notamment à travers l'administration de composés proélectrophiles pouvant directement activer la libération de Nrf2 (Lipton, Rezaie et al. 2016).

Par ailleurs, la régulation des défenses antioxydantes par Nrf2 est aussi étroitement impliquée dans la réponse anti-inflammatoire, telle que démontrée chez des animaux où l'inflammation est réduite grâce à un activateur de Nrf2 (Ahmed, Luo et al. 2017). Son rôle dans l'inflammation n'est pas totalement élucidé, mais sa relation avec le facteur Nf-kB entre en jeu. En effet, Nair et al en 2008 ont caractérisé des sites de liaisons de Nf-kB dans la région promotrice de Nrf2 (Nair, Doh et al. 2008) ce qui suggère une étroite relation dans leur régulation.

Le facteur de transcription est NF-κB :

Ce facteur est étroitement impliqué dans la réponse inflammatoire. Tout comme le facteur Nrf2, c'est un acteur redox-dépendant dont l'activation est intimement liée à la régulation du stress oxydatif. Il est composé de plusieurs sous-unités, p50, p52, p65, c-Rel et c-RelB. Ces protéines sont organisées sous forme de dimères et sont maintenues inactives dans le cytoplasme par les inhibiteurs IκB. Un stimulus inflammatoire ou oxydatif entraîne la phosphorylation d'IκB par les kinases spécifiques IκK pour induire un signal de dégradation. Le facteur NF-κB peut alors migrer dans le noyau pour réguler l'expression de ses gènes cibles.

L'activation des gènes impliqués dans la neuro-inflammation conduit à la formation de EROs, ERNs et cytokines pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, d'où un rôle dans la neurodégénérescence. Cependant, l'activation constitutive de NF-κB est indispensable à l'activation des SOD mitochondriales et cytoplasmiques. Ainsi, la modulation de NF-κB peut également participer à la survie neuronale. La modulation de l'activité de ce facteur redox a été proposée comme cible thérapeutique potentielle pour diminuer le stress oxydatif neuronal (Ganesh, Negi et al. 2013, Shih, Wang et al. 2015).

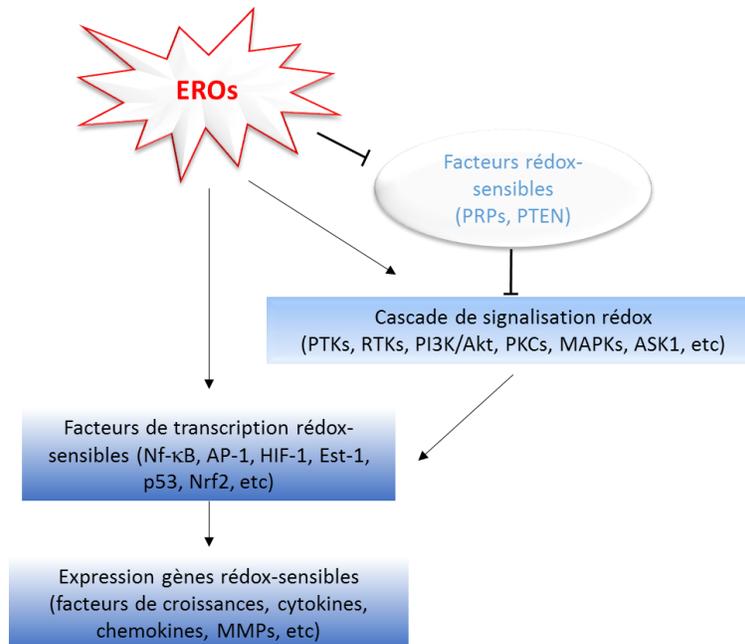


Figure 9 : Voies de signalisations activées par les EROs et expression des facteurs de transcriptions associés.

PTPs : protein tyrosin phosphatases; PTEN : phosphatase and tensin homolog; PTK : protein tyrosine kinases; RTKs : receptor tyrosine kinases ; MMPs : Matrix metalloproteinases.

Adapté de (Leonarduzzi, Sottero et al. 2010).

II. La Maladie d'Alzheimer et la Maladie de Parkinson : des maladies liées au stress oxydatif

II.A. Généralités

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (MA et MP) sont des maladies du système nerveux caractérisées par une mort progressive des neurones. La dégénération neuronale entraîne une diminution des fonctions cognitives qui peuvent se manifester sous de multiples formes, dont l'altération de la mémoire, des troubles de l'orientation et des fonctions exécutives, ou encore des troubles de raisonnement et de jugement. Ces troubles sont regroupés sous le terme de démences et sont représentés dans 60 % des cas par la MA, et en plus faible proportion par la MP. La prévalence de la MA au Canada est de 564 000 personnes, et jusqu'à 900 000 en France (Prince, Wimo et al. 2015, Canada 2016).

Les prévisions d'évolution de la prévalence des maladies neurodégénératives (MND) sont alarmantes. Le vieillissement de la population entraîne une augmentation des personnes à risque. Rien qu'en France, 225 000 nouveaux cas de MA sont référencés chaque année, 25 000 au Canada. (Prince, Wimo et al. 2015, Canada 2016). Les projections démographiques annoncent que 28 % de la population aura plus de 65 ans d'ici 2050 (Bohnert, Chagnon et al. 2015, Eurostat 2019). L'OMS estime que 25 à 30 % des personnes âgées de plus de 85 ans sont atteintes de troubles cognitifs (OMS 2016), dont 50 millions de personnes atteintes de démences (OMS 2017). Ce chiffre atteindra 82 millions de cas déclarés d'ici 2030. Selon l'organisme Santé Canada, deux tiers des personnes touchées sont des femmes (Bohnert, Chagnon et al. 2015).

Au-delà du coût annuel mondial estimé à 818 milliards de dollars US pour la prise en charge des démences, la maladie d'Alzheimer représente aujourd'hui en France la 4^{ème} cause de décès chez les personnes âgées, et la 8^{ème} cause au Canada. Ces estimations du coût humain et financier de la MA en font un des problèmes de santé majeurs du 21^e siècle.

II.B. Caractéristiques physiopathologiques

II.B.a. Atrophies cérébrales

Pour la MA, la dégénérescence neuronale se traduit par une atrophie cérébrale des neurones cholinergiques au niveau de l'hippocampe et des cortex entorhinaux (Scahill, Schott et al. 2002). Dans la MP, les cortex frontaux et temporaux sont atteints, mais c'est la dégénération de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) qui entraîne une perte progressive de l'innervation dopaminergique du striatum et les troubles moteurs (Burton, McKeith et al. 2004, Dagher, Miguel et al. 2015). L'évolution des atrophies démontre d'une part que celles-ci augmentent

progressivement avec le développement des maladies, d'autre part, que certaines régions sont atrophiées avant même l'apparition des premiers symptômes (Scahill, Schott et al. 2002, Ramos Bernardes da Silva Filho, Oliveira Barbosa et al. 2017).

II.B.b. Protéinopathies

Bien que l'origine de la dégénérescence neuronale sélective de certaines régions ne soit pas élucidée, la présence de lésions dans les neurones est étroitement associée à la présence d'agrégats protéiques inter- et intra-neuronaux. Plusieurs MND sont caractérisées comme des protéinopathies, maladies présentant une accumulation anormale de protéines altérées.

Parmi les inclusions protéiques pathologiques, les plus connues sont les plaques amyloïdes, aussi appelées les plaques séniles, ainsi que les DNF (dégénérescences neurofibrillaires) qui sont particulièrement présentes pour la MA. Les plaques séniles localisées dans l'espace inter-neuronal sont principalement constituées du peptide amyloïde- β ($A\beta$) oligomérisé. Elles sont stables et résistantes aux protéases (Selkoe, Abraham et al. 1986). L'importance des plaques séniles dans les zones cérébrales fortement touchées par la MA (hippocampe et cortex frontaux temporaux) est à l'origine de l'hypothèse de la voie amyloïdogénique comme facteur principal du développement de la MA mais leur accumulation ne corrèle pas avec la détérioration des fonctions cognitives cliniquement mesurables (Braak and Braak 1991, Serrano-Pozo, Qian et al. 2016) et semblent favorisée par le stress oxydatif (Tabner, El-Agnaf et al. 2005). L'accumulation de DNF est présente dans plusieurs maladies neurodégénératives, appelées collectivement les tauopathies. La MA est la plus connue d'entre elles et la MP est aussi reconnue comme une tauopathie dans certains cas (Wray and Lewis 2010). Les DNF sont constitués de filaments hélicoïdaux insolubles issus de l'accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée, responsable de la stabilité des microtubules en conditions physiologiques. L'hyperphosphorylation favorise son agrégation et la dépolymérisation des microtubules (Alonso, Zaidi et al. 2001). Contrairement aux plaques séniles, une corrélation a été établie entre le niveau d'accumulation des DNF et le déclin cognitif dans la MA (Braak and Braak 1991). L'origine de cette hyperphosphorylation est mal connue, mais est considérée comme un événement précoce dans le développement de la MA et semble liée au stress oxydatif (Ho, Yang et al. 2012, Liu, Li et al. 2015).

Les corps de Lewi sont des inclusions protéiques plus généralement caractéristiques de la MP, mais sont aussi présents dans 30 à 60 % des cas de MA (Hansen, Salmon et al. 1990, Kazee and Han 1995, Hamilton 2000). Ce sont des agrégats d' α -synucléine oligomérisée (Spillantini 1998,

Spillantini, Crowther et al. 1998). Tout comme pour l'A β , les oligomères toxiques d' α -synucléine induisent des altérations neuronales à travers l'altération des fonctions mitochondriales, l'altération des lysosomes ou encore des microtubules et génèrent une augmentation du stress oxydatif (Lashuel, Overk et al. 2013, Gan and Johnson 2014).

Ces différentes caractéristiques morphologiques sont utilisées pour poser un diagnostic certain de la MA ou de la MP en *post mortem*. De plus, leurs cinétiques d'apparition ont été largement étudiées et permettent leur mise en relation avec les symptômes cliniques de la MA et de la MP.

II.B.c. Des maladies évolutives

Ces différentes inclusions protéiques n'apparaissent pas aux mêmes moments du développement de la maladie et ne sont pas toujours corrélées avec les symptômes cliniques mesurables de la MA ou de la MP. Suite à l'observation des cerveaux *post mortem* de patients atteints, six stades prédictibles ont été observés (Figure 10) (Braak, Del Tredici et al. 2003), (Braak and Braak 1991). Dans la MA, les DNF, corrélés aux déclinés cognitifs, apparaissent avant les plaques amyloïdes (Braak and Braak 1991, Duyckaerts, Bennechib et al. 1997). Contrairement aux niveaux d'oligomères fibrillés solubles d'A β intra-neuronaux (précurseurs des plaques amyloïdes), l'apparition des plaques amyloïdes ne correspond pas à l'apparition des déclinés cognitifs (Villemagne, Pike et al. 2011, Serrano-Pozo, Qian et al. 2016).

Dans le cas de la MP, les stades un et deux sont dits asymptomatiques, car cliniquement non détectables, l'apparition des premiers symptômes cliniques correspondant aux stades trois et quatre (Figure 10) (Braak, Del Tredici et al. 2002). L'apparition des troubles cognitifs est plus susceptible à partir des stades trois à six pour la MP (Braak, Rüb et al. 2005), et seulement à partir du stade IV pour la MA (Braak and Braak 1991).

Ces études mettent en évidence le caractère évolutif des maladies et mettent l'accent sur l'apparition des symptômes cliniques à des stades avancés (Figure 10). Cette observation ouvre la voie à des interventions de préventions pour limiter le basculement des sujets à risques vers la déclaration avérée de la maladie. En effet, jusqu'à 50 % des patients MCI (Mild Cognitive Impairment) développent une démence de type MA dans les cinq ans (Gauthier, Reisberg et al. 2006).

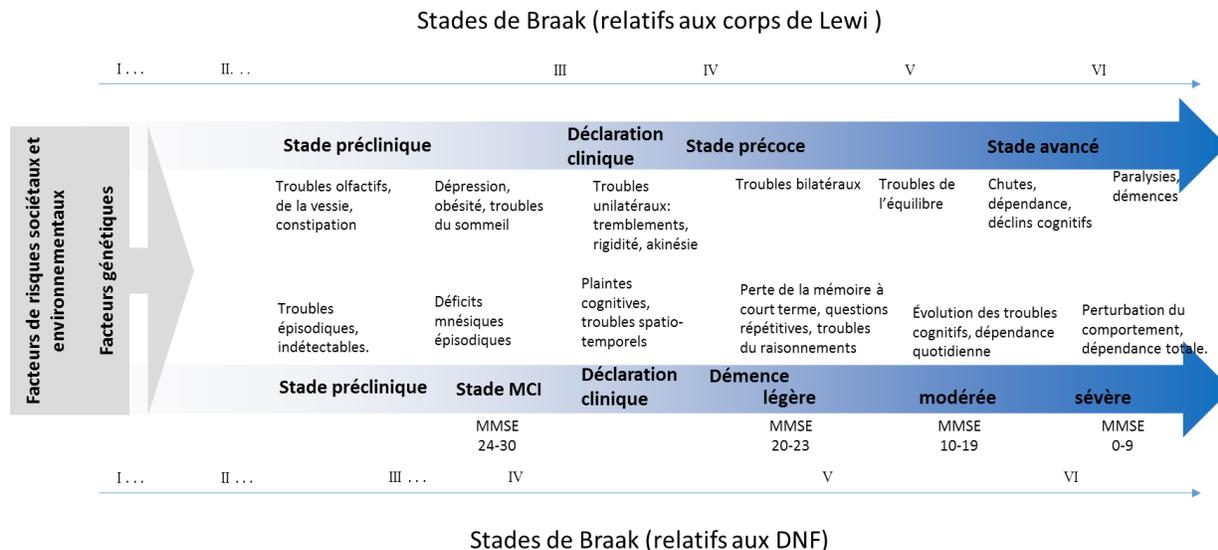


Figure 10 : Progression de la MA et de la MP : les différents stades cliniques en fonctions des symptômes cliniques et les stades de Braak associés.

Adaptée de (Di Meo, Lemaur et al. 2013, Kalia and Lang 2015) (Hawkes, Del Tredici et al. 2010, Dangles, Dufour et al. 2017) (Petrella, Coleman et al. 2003)

II.C. Facteurs de risques

II.C.a. Génétiques

Plusieurs formes de la MA et de la MP se distinguent par leur origine. Certaines formes familiales apparaissant avant l'âge de 65 ans pour la MA et dès 40 ou 50 ans pour la MP. Elles sont causées par des mutations génétiques autosomales dominantes ou récessives, comme des mutations dans les gènes codant pour la préséniline 1 (PS1), l'APP ou la PS2 dans le cas de la MA (Castellani, Plascencia-Villa et al. 2019). Les mutations génétiques connues pour déclencher la MP touchent une plus vaste catégorie de fonctionnements cellulaires. Les mutations dans le gène SNCA codant pour l' α -synucléine, impliquent une augmentation de la formation de neurofibrilles toxiques (Parihar, Parihar et al. 2009). Les mutations dans les gènes LRRK2, park2 ou park 6 entraînent des dysfonctionnements importants au niveau des systèmes d'élimination des protéines et dans l'homéostasie mitochondriale, entraînant une augmentation du stress oxydatif et de l'apoptose (Giasson, Covy et al. 2006, Mortiboys, Johansen et al. 2010) (Valente, Abou-Sleiman et al. 2004) (Gaweda-Walerych and Zekanowski 2013, Trempe and Fon 2013).

Les formes sporadiques se déclarent plus tardivement et représentent 95 % des cas de MA ou de MP. L'origine reste inconnue à ce jour, mais plusieurs prédispositions génétiques sont

suspectées. Par exemple, Poirier et al. ont observé que 70 % des individus atteints de la MA présentaient une homozygotie de l'allèle $\epsilon 4$ pour le gène de l'apolipoprotéine E (APOE), codant pour une lipoprotéine exprimée dans le foie et le cerveau (Poirier, Davignon et al. 1993). La différence de deux acides aminés en position 112 et 158 (Cys \rightarrow Arg) dans l'isoforme $\epsilon 4$ par rapport à l'isoforme majoritaire $\epsilon 3$, associée à un effet protecteur, diminue l'activité antioxydante de l'ApoE, diminue son affinité pour des récepteurs de la barrière hématoencéphalique (BHE) impliqués dans la clairance de l'A β et modifie la susceptibilité de la protéine aux clivages protéolytiques conduisant à des fragments neurotoxiques (Miyata and Smith 1996, Ramassamy, Averill et al. 1999, Deane, Sagare et al. 2008). L'implication du stress oxydatif entre l'Apo $\epsilon 4$ et l'A β semble importante, car cette interaction est inhibée en présence d'agents réducteurs (Strittmatter, Weisgraber et al. 1993).

D'autres prédispositions génétiques impliquées dans le métabolisme de l'A β , de la protéine Tau, du cholestérol, de la réponse immunitaire ou encore de l'endocytose ont plus récemment été relevées (Karch and Goate 2015). Cependant, contrairement aux mutations identifiées dans les formes familiales des MND, la présence de ces variations génétiques plus ou moins fréquentes n'est pas automatiquement liée au développement des maladies.

II.C.b. Facteurs non génétiques

Un des premiers facteurs de la dégénérescence neuronale est le vieillissement. Les modifications cognitives et neuronales font partie du processus normal de vieillissement. En absence de démence, le cerveau des personnes âgées peut perdre jusqu'à 1 % de leur volume chaque année (Fjell Anders and Walhovd Kristine 2010). Toutes les parties cérébrales atrophiées chez les patients atteints de MA sont aussi atrophiées chez les personnes âgées saines, mais dans une moindre mesure. De même, le dépôt des plaques amyloïdes, la présence de corps de Lewi et d'enchevêtrements neurofibrillaires existent aussi chez certaines personnes âgées saines (Braak and Del Tredici 2011, Bobela, Aebischer et al. 2015).

Lorsque le vieillissement normal est associé à d'autres facteurs de risques dépendamment des habitudes de vie, il peut se transformer en vieillissement pathologique. L'hypertension, l'obésité et le diabète sont en effet fortement suspectés d'augmenter les troubles cognitifs (Faraci 2011, Iadecola 2013) (Chen, Volle et al. 2019) (Adams, Grandpre et al. 2019). En effet, la MA est parfois nommée un diabète de type 3. Outre l'influence sur l'apport de glucose aux neurones, l'insuline possède plusieurs rôles majeurs dans le cerveau (De Felice 2013). Elle serait impliquée dans la plasticité synaptique, la survie neuronale, le métabolisme mitochondrial et la protection des

neurones de l'hippocampe contre la toxicité induite par les formes solubles toxiques de l'A β (Kim and Han 2005, Van Der Heide, Kamal et al. 2005, De Felice, Vieira et al. 2009, Cheng, Tseng et al. 2010) De plus, l'inflammation chronique et le degré important de stress oxydatif sont communs aux deux maladies, tout comme dans les cas d'obésité (Arnold, Arvanitakis et al. 2018).

L'alimentation est une voie importante dans l'incidence de la MP ou de la MP. En effet, conjuguée à une augmentation des risques d'obésité et de diabète, la consommation d'une diète de type Western (caractérisée par un apport important de graisses saturées et de sucres raffinés) favorise un déficit de l'apprentissage et de la mémoire ainsi que des troubles de l'attention (Kanoski and Davidson 2011, Francis and Stevenson 2013). *In vivo*, il suffit de seulement quatre semaines d'alimentation Western pour que les souris développent une augmentation des marqueurs du stress oxydatif dans le cerveau en comparaison des souris nourries avec une diète classique (Studzinski, Li et al. 2009), ce qui montre l'influence majeure de la diète sur l'induction du stress oxydatif au niveau cérébral.

Concernant la MP, l'exposition aux pesticides comme le paraquat, le 1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium dichloride (MPTP), un herbicide largement utilisé durant les années 2000 dans les cultures de bananes, ou encore la roténone sont aujourd'hui reconnus comme facteurs de risques dans l'apparition de la maladie (Dauer and Przedborski 2003) (Dinis-Oliveira, Remiao et al. 2006).

Livingston et al. ont récemment montré que 35 % des démences étaient attribuables à neuf facteurs de risques classifiés en fonction leurs incidences (Tableau 3). Leur étude met en avant que huit facteurs de risques sur dix contribuent pour 27 % dans l'apparition des démences et sont potentiellement modifiables en améliorant l'environnement, les habitudes de vie des individus et donc l'exposition aux générateurs de stress oxydatif d'origine exogène (Livingston, Sommerlad et al. 2017). Enfin, plusieurs études suggèrent une augmentation du stress oxydatif lors d'un manque ou d'une mauvaise qualité de sommeil (Musiek, Lim et al. 2013, Ju, Lucey et al. 2014) (Ju, Ooms et al. 2017).

Les neurodégénérescences caractéristiques de la MA et de la MP sont d'origines multifactorielles. Cependant, une composante métabolique commune à tous les facteurs de risques est l'apparition d'un stress oxydatif important.

Tableau 3 : Classification des facteurs de risque.

Adapté de (Livingston, Sommerlad et al. 2017).

	Facteurs de risques	Contribution des risques dans l'apparition de démences.	Stade de vie concerné par l'apparition du facteur de risque
Non modifiables	Ensemble des facteurs non modifiables (âge, génétique,...)	65 %	
	APOE4	7 %	Début de vie
Potentiellement modifiables	Faible éducation (Absence d'école secondaire)	8 %	
	Perte de l'audition	9 %	
	Hypertension	2 %	Milieu de vie
	Obésité	1 %	
	Consommation de tabac	5 %	
	Dépression	4 %	
	Manque d'activité physique	3 %	Individus âgés
	Isolement social	2 %	
Diabète	1 %		

II.D. Le stress oxydatif dans la Maladie d'Alzheimer et la Maladie de Parkinson

La principale cause de la neurodégénérescence est le vieillissement. Dès 1956, Harman D. émet la théorie du vieillissement induit par les radicaux libres (Harman 1956). Cette hypothèse stipule que le vieillissement est la conséquence d'une accumulation d'altérations biochimiques des macromolécules de l'organisme sous l'action des ROS, dont la prise en charge s'altère au fil des années. Les facteurs héréditaires associés aux différents stress vécus au cours de la vie détermineraient l'altération métabolique individuelle. En 1980, Miquel J. et al propose que cette théorie soit médiée par les mitochondries (Miquel, Economos et al. 1980). La mitochondrie est la première source d'EROs intracellulaires, toutes cellules confondues et donc la première exposée aux dommages oxydatifs. Ces dommages conduiraient à une augmentation de l'altération de l'ADNmt, diminueraient l'activité de certaines enzymes comme la chaîne de transport des électrons, augmenteraient le nombre d'altérations morphologiques des mitochondries et diminueraient le potentiel membranaire mitochondrial. Tous ces événements conduisent à l'augmentation des EROs intracellulaires (Mataix, Ochoa et al. 2004). Or, dans MA et la MP plusieurs de ces caractéristiques sont présentes, notamment d'importantes altérations des

macromolécules, ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial, comme le décrivent les paragraphes suivants.

II.D.a. Sensibilité du cerveau à l'oxygène

Le cerveau est particulièrement sensible à l'oxygène : il consomme 20 % de l'oxygène total de l'organisme. Il dispose de moins de défenses antioxydantes que d'autres organes, contient de fortes concentrations de lipides polyinsaturés particulièrement sensibles à l'oxydation et enfin il est particulièrement riche en métaux de transition, tel que le fer (Fe^{2+}), impliqués dans la production de radicaux hydroxyles (Halliwell 1992) (Tuck, Freeman et al. 2001). Le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (OH8dG), marqueur de l'ADN oxydé, est augmenté dans le cerveau de manière progressive en corrélation avec l'âge des sujets, lors du décès, avec une prévalence plus importante pour l'ADN mitochondrial (ADNmt) en comparaison de l'ADN nucléaire (ADNn) (Mecocci, MacGarvey et al. 1993). Or des anomalies dans l'ADNmt ont été remarquées comme étant à l'origine d'une diminution de l'activité du complexe I (Gu, Cooper et al. 1998), elle-même à l'origine d'une importante source de ROS.

Bien que la génération d'EROs soit un processus physiologique indispensable (Dickinson, Peltier et al. 2010), elle doit suivre un processus contrôlé permettant de maintenir un équilibre pour prévenir l'apparition du stress oxydatif. Or, dans la MA et dans la MP, de nombreuses évidences montrent que cet équilibre n'est pas respecté.

II.D.b. Augmentation des marqueurs du stress oxydatif

Augmentation des lipides oxydés

De nombreuses évidences montrent l'existence d'une peroxydation lipidique importante dans le cerveau des sujets atteints de MA ou de MP. Des protéines liées au 4-HNE, sont retrouvées augmentées dans les cerveaux de sujets atteints de la MA et de MP en comparaison des cerveaux de sujets contrôles du même âge (Yoritaka, Hattori et al. 1996) (Kirchner, Hallagan et al. 2000) (Sultana and Butterfield 2010). Dans la MP, environ 58 % des neurones de la SNpc sont positifs au 4-HNE, contre seulement 9 % dans les cerveaux contrôles (Yoritaka, Hattori et al. 1996). Dans la même région cérébrale, l' α -synucléine est colocalisée avec l'acroléine et le 4-HNE, ce qui témoigne d'une forte peroxydation lipidique particulière dans les neurones dopaminergiques chez les sujets atteints de MP (Shamoto-Nagai, Maruyama et al. 2007). Dans la MA, les concentrations d'isoprostane-F2, un autre sous-produit issu de la peroxydation lipidique, sont multipliées par 2,5

dans l'hippocampe dans les stades avancés de la MA (Singh, Dang et al. 2010), mais pas dans la SN des patients MP où sont augmentés uniquement les isofuranes (Fessel, Hulette et al. 2003).

Augmentation des marqueurs de l'ADN oxydé

Les marqueurs révélant l'oxydation de l'ADN sont augmentés dans la MA et la MP en comparaison chez les sujets sains. Une augmentation de 8-hydroxyguanine issue de l'ADN est présente dans les lobes frontaux et pariétaux de sujets MCI et MA (Migliore, Fontana et al. 2005, Wang, Markesbery et al. 2006) (Dias, Junn et al. 2013), ainsi que dans la SN des sujets atteints de MP (Alam, Jenner et al. 1997). De plus, 30 à 70 % des ARNm dans le cortex frontal de sujets atteints de MA sont oxydés (Shan and Lin 2006). Cette quantité atteint les 67 % pour l'ARNm codant pour la Presenilin1, protéine impliquée dans le clivage de l'APP pouvant mener à la formation d'A β 1-42 ou de sa forme non toxique, 66 % pour l'ARNm codant pour la SOD1 et 62 % pour l'ARNm codant pour la carbonyle réductase 1, deux enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes. Ces altérations peuvent engendrer des protéines altérées et augmenter la génération de stress oxydatif.

Augmentation des protéines carbonylées

L'augmentation des niveaux de protéines carbonylées est aussi un marqueur important de la présence du stress oxydatif dans la MA et la MP (Butterfield, Poon et al. 2006, Dias, Junn et al. 2013). L'analyse de l'interactome de protéines oxydées spécifiques montre que ces altérations touchent des voies cellulaires impliquées dans le métabolisme énergétique ainsi que dans la plasticité synaptique (Bubber, Haroutunian et al. 2005, Butterfield, Poon et al. 2006, Sultana and Butterfield 2009). L'augmentation des niveaux de protéines carbonylées semble corrélée avec le dysfonctionnement de la mémoire (Keller, Schmitt et al. 2005).

Diminution des défenses antioxydantes

L'augmentation des marqueurs du stress oxydatif dans les cerveaux issus de patients atteints de MA et de MP est étroitement liée à une diminution des antioxydants endogènes ainsi qu'à une diminution des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS.

Les concentrations en GSH par comparaison au GSSG (GSH oxydé) sont diminuées dans les cerveaux d'individus atteints de MA, par comparaison avec des cerveaux âgés sains, plus particulièrement dans le noyau caudé et dans l'hippocampe (Benzi and Moretti 1995). Dans la MP, cette diminution semble spécifique de la SN (Sian, Dexter et al. 1994) et corrèle avec la

gravité des symptômes (Riederer, Sofic et al. 1989, Sofic, Lange et al. 1992). Les antioxydants non endogènes comme l' α -tocophérol (vitamine E) ou l'acide ascorbique (vitamine C) sont aussi diminués dans le plasma des sujets MCI et MA par comparaison avec des sujets sains (Rinaldi, Polidori et al. 2003, Baldeiras, Santana et al. 2008, Mangialasche, Xu et al. 2012). Cette diminution reflète le déséquilibre rédox des patients.

Les études menées sur l'oxydation des protéines ou la formation d'adduits avec les produits issus de la peroxydation lipidique ont montrées que certaines enzymes impliquées dans la détoxification des EROs étaient modifiées, et possiblement rendues non fonctionnelles. De fait, l'activité plasmatique de la SOD et de la glutathion peroxydase (GPx) est diminuée chez les MCI et les MA (Rinaldi, Polidori et al. 2003, Padurariu, Ciobica et al. 2010), tandis que l'activité de la thiorédoxine réductase et de la biliverdine réductase-A, enzyme antioxydante, est augmentée dans les cerveaux de sujets atteints de MA (Akterin, Cowburn et al. 2006) (Barone, Di Domenico et al. 2011). Cependant, la biliverdine présente une activité enzymatique diminuée. De manière plus générale, pour la MA comme pour la MP, les études concernant les activités et les quantités d'enzymes antioxydantes plasmatiques ou cérébrales sont contradictoires (Fahn and Cohen 1992, Sultana and Butterfield 2010). Une baisse des quantités / activités peut traduire une altération de ces protéines causée par le stress oxydatif et à l'inverse, une augmentation traduit une activation des systèmes de défense cellulaires et donc une surproduction de ROS.

II.D.c. Implication du stress oxydatif dans la physiopathologie

L'observation des différents marqueurs du stress oxydatif dans la MA et la MP est indiscutable. Les caractéristiques physiopathologiques sont liées à la production de stress oxydatif. Son implication dans les dysfonctionnements neuronaux est largement démontrée. Cependant, la discussion reste ouverte sur l'apparition du stress oxydatif en tant que cause ou conséquence des dysfonctionnements neuronaux.

Rôle de l'A β , de l' α -synucléine et des DNF

Les petits oligomères d'A β ou d' α -synucléine sont générateurs de stress oxydatif (Butterfield, Swomley et al. 2012, Lashuel, Overk et al. 2013). Ils sont présents en plus forte quantité dans les cerveaux issus de sujets atteints de la MA (Tomic, Pensalfini et al. 2009), peuvent s'insérer dans les membranes plasmiques et générer la peroxydation des lipides environnants (Butterfield and Lauderback 2002, Shamoto-Nagai, Hisaka et al. 2018). Dans les neurones en culture, l'A β ₁₋₄₂

⁴² induit la production de 4-HNE et d'acroléine (Mark, Lovell et al. 1997, Belkacemi and Ramassamy 2015). De plus, dans les modèles *in vivo*, la surexpression d'Aβ₁₋₄₂ induit une augmentation générale du stress oxydatif qui se traduit par une augmentation des protéines carbonylées (Yatin, Varadarajan et al. 1999, Boyd-Kimball, Poon et al. 2006, Belkacemi and Ramassamy 2012). Cette augmentation peut atteindre 176 % de protéines oxydées par rapport aux contrôles, et semble toucher des protéines spécifiques. La toxicité de l'Aβ sur des cellules neuronales en culture peut être diminuée par l'utilisation d'antioxydants comme la vitamine E (Giraldo, Lloret et al. 2014), ou par certains polyphénols (Belkacemi and Ramassamy 2015) ce qui soutient l'implication du stress oxydatif dans la mort neuronale.

Plusieurs études suggèrent que le stress oxydatif lui-même génère l'oligomérisation de ces protéines. L'induction d'un stress oxydatif par le H₂O₂ dans les cellules de neuroblastomes en culture induit la mort des cellules à travers l'oligomérisation de l'Aβ, elle-même générant une production de H₂O₂ (Zhang, Zhao et al. 1997, Tabner, El-Agnaf et al. 2005). L'augmentation du stress oxydatif dans les modèles *in vivo* de type *Caenorhabditis elegans* (CL4176) ou encore dans les modèles de souris relatifs aux dépôts amyloïdes (souches Thy1-APP751_{sL}, Tg2576, APP/PS1 et 3xTg-AD) précède l'apparition des dépôts amyloïdes (Boyd-Kimball, Poon et al. 2006, Belkacemi and Ramassamy 2012). Cette augmentation est, dans la plupart des souches, accompagnée d'une dérégulation des enzymes antioxydantes, et plus particulièrement de la SOD. L'oligomérisation de l'α-synucléine est aussi favorisée par la présence d'α-synucléine oxydée ou d'adduits -HNE-α-synucléine (Gan and Johnson 2014), ce qui suggère une apparition du stress oxydatif antérieure à la formation des oligomères.

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau induite par l'Aβ₁₋₄₂ est inhibée en présence d'agents antioxydants (Giraldo, Lloret et al. 2014). Pour confirmer l'implication du stress oxydatif dans l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, l'équipe de Melov S. et al. ont traité des souris déficientes en SOD2 avec un complexe enzymatique mimant la catalase et la SOD (EUK 189). Outre leur faible durée de vie, ces souris présentent une hyperphosphorylation de la protéine Tau qui est contrebalancée par le traitement antioxydant (Melov, Adlard et al. 2007). De plus, les souris mutantes qui surexpriment la protéine Tau humaine (souche de souris P301S) montrent une augmentation importante des marqueurs de stress oxydatif, notamment au niveau de la mitochondrie et des enzymes associées au catabolisme énergétique (Dumont, Stack et al. 2011). Tout comme pour les plaques amyloïdes, ces marqueurs de stress oxydatif apparaissent avant la formation des DNF. Ces études démontrent l'implication du stress oxydatif dans la génération des DNF. Cependant, la génération de stress oxydatif induite par la présence des DNF,

particulièrement au niveau mitochondrial, mérite d'être soulignée (David, Hauptmann et al. 2005). De plus, il est important de souligner que l'état de phosphorylation de la protéine tau s'opère par l'action successive de kinases et de phosphatases comme la glycogène synthase kinase-3 (GSK3 β /tau Protein Kinase I) qui est considérée comme la kinase de tau majoritaire, mais aussi par les kinases dépendantes du cycle cellulaire (CDK5/tau Protein Kinase II) ou encore c-jun N-terminal Kinase (JNK), Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2), et p38. Les phosphatases impliquées sont les phosphatases-1 (PP1), -2A (PP2A), -2B (PP2B), -5 (PP5), qui déphosphorylent Tau (Martin, Latypova et al. 2013, Martin, Latypova et al. 2013). La régulation de l'activité de ces enzymes peut-être fortement perturbée par la présence d'EROs comme le démontre l'activation importante de la kinase GSK3 β et la phosphorylation de tau subséquente suite à l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules corticales de rat traitées avec du fer de du peroxyde d'hydrogène (Lovell, Xiong et al. 2004). L'activation de cette kinase semble particulièrement sensible à la présence d'EROs, conduisant à une phosphorylation importante de tau en conditions oxydatives (Feng, Xia et al. 2013).

Rôle des dysfonctionnements mitochondriaux

L'altération du métabolisme mitochondrial observé dans la MA et la MP conduit à une augmentation de la production d'EROs intracellulaires (Hirai, Aliev et al. 2001). Les oligomères d'A β , les plaques séniles et les DNF peuvent interagir avec les mitochondries et altérer le transport d'électrons, menant à une augmentation du stress oxydatif (Hauptmann, Keil et al. 2006).

Par ailleurs, dans les cerveaux *post mortem* des patients atteints de MP, une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est retrouvée dans la *SNpc* (Schapira, Cooper et al. 1990, Mann, Cooper et al. 1992). L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la MP est capitale pour le développement de la maladie. Les neurotoxines comme le MPP⁺, la roténone ou le paraquat ont toutes la particularité de bloquer la chaîne respiratoire mitochondriale. (Przedborski, Jackson-Lewis et al. 2000, Dauer and Przedborski 2003, Schapira 2010).

Dérégulation du métabolisme énergétique

Les dysfonctionnements mitochondriaux sont intimement liés à une dysfonction du métabolisme énergétique, notamment via une altération de l'activité de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (Bubber, Haroutunian et al. 2005, Cheng, Tseng et al. 2010).

Par ailleurs, une résistance à l'insuline a été observée chez les patients atteints de MA, ainsi qu'une diminution des récepteurs à l'insuline dans les cerveaux d'individus atteints de MA (Craft, Peskind et al. 1998). Or, l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire génère une résistance

à l'insuline dans les modèles *in vivo* (Barone and Butterfield 2015).(Al-Lahham, Deford et al. 2016).

Importance des métaux de transitions

La présence de fer libre est délétère pour l'organisme, d'où sa prise en charge par la transferrine en conditions physiologiques. Or, les concentrations en fer sont augmentées dans le cortex frontal des sujets atteints de la MA et dans le *globus pallidus* (structure sous-corticale des ganglions de la base) et dans la *SNpc* des cerveaux atteints de la MP (Sofic, Riederer et al. 1988) (Loeffler, Connor et al. 1995). L'implication du fer dans la MA et la MP est soutenue par certaines mutations du gène codant pour la ferritine qui sont connues pour causer une neurodégénérescence (Barbeito, Garringer et al. 2009). De plus, l'administration intranasale d'un chélateur de métaux, la déféroxamine, chez les souris mutantes APP/PS1 ou P301L entraîne l'amélioration de la mémoire spatiale, sans modifier les taux des dépôts amyloïdes ou les DNF (Fine, Baillargeon et al. 2012, Hanson, Fine et al. 2012).

La neuro-inflammation

Les marqueurs de l'inflammation sont élevés dans la MA et dans la MP. L'existence d'une inflammation dite « de bas grade » (présence d'agents pro-inflammatoires en absence d'infection) chronique est classiquement retrouvée chez les sujets âgés, mais certains marqueurs sont augmentés dans la MA et la MP. Plusieurs facteurs impliqués dans l'inflammation sont retrouvés augmentés dès le stade MCI dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Brosseron, Träschütz et al. 2018). Des cytokines pro-inflammatoires comme IFN- γ participent à la production d'A β (Giunta, Fernandez et al. 2008) et à l'atrophie de l'hippocampe (Magalhães, Weiler et al. 2018). De plus, un nombre important de cellules microgliales activées, indicateur de la neuro-inflammation, ont été trouvées dans la *SNpc* de cerveaux *post mortem* de patients atteints de MP (McGeer, Itagaki et al. 1988). Les concentrations en TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 sont augmentées dans le striatum et la *SNpc* des patients MP (Mogi, Harada et al. 1994, Mogi, Harada et al. 1994). L'impact de l'inflammation chronique est confirmé par les études *in vivo*. La stimulation chronique de la réponse immunitaire entraîne l'apparition des plaques amyloïdes et l'accumulation de la protéine Tau phosphorylée (Krstic, Madhusudan et al. 2012). Dans un modèle de MP, l'infiltration de lymphocytes T a été observée spécifiquement dans la région nigrostriatale de souris traitées au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), un pesticide aujourd'hui reconnu pour favoriser le développement de la MP (Hirsch and Hunot 2009).

Les processus impliqués dans la neuroinflammation sont complexes et font intervenir les facteurs de transcription NF- κ B, JNK et p38-MAP-kinase. Or, ces facteurs sont retrouvés fortement augmentés dans les cerveaux de patients atteints de MP et de MA, corroborant l'implication de l'inflammation et du stress oxydatif associé dans le développement de ces maladies (Tak and Firestein 2001) (Magalhães, Weiler et al. 2018).

II.D.d. Dérégulation des facteurs redox

Les altérations métaboliques de la MA et de la MP sont favorisées par le stress oxydatif, mais sont elles-mêmes une source de production de ROS. L'existence de cette relation circulaire entre génération de stress oxydatif et dysfonctionnement cellulaire semble être à la base de la progression de la MA et de la MP, et conduit à la mort des neurones.

L'implication du déséquilibre rédox dans la neurodégénérescence est soutenue par l'observation d'une dérégulation des facteurs de régulation de l'état rédox dans la MA et la MP par rapport aux sujets sains. Chez les patients atteints de la MA, Nrf2 est inactivé et semble être retenu dans le cytoplasme au lieu de migrer dans le noyau (Ramsey and Giasson 2007, Sheng, Wang et al. 2012). Cela se traduit par une sous activation des facteurs impliqués dans la réponse antioxydante régulée par le facteur Nrf2 dans les cerveaux de sujets atteints de MA et MP (Wang, Li et al. 2017). Les conséquences de l'inactivation de Nrf2 se reflètent, par une diminution des niveaux des antioxydants. L'importance de cette voie dans le maintien des fonctions cognitives est confirmée chez les animaux mimant certaines caractéristiques de la MA ou de la MP (Mellick and George 2016, Becker 2017). Les souris APP/PS1 surexprimant l'A β , possèdent une sous-régulation de la voie Nrf2. La surexpression de cette voie dans l'hippocampe améliore la mémoire spatiale, diminue l'activation microgliale et augmente l'expression d'enzymes antioxydantes (Kanninen, Heikkinen et al. 2009). Dans ce modèle, la sous-expression de Nrf2 peut aussi être renversée par un traitement avec le *tert*-butylhydroquinone, un antioxydant (Kanninen, Malm et al. 2008).

Le facteur Nf- κ B est activé de manière constitutive chez les sujets souffrant d'inflammation chronique (Vallabhapurapu and Karin 2009). Du fait de la présence de neuro-inflammation dans la MA et la MP, la forme active de ce facteur est retrouvée en quantité plus importante dans les cerveaux en *post mortem* de patients atteints de MA et MP par comparaison aux cerveaux contrôles de personnes du même âge (Hunot, Brugg et al. 1997, O'Neill and Kaltschmidt 1997, Mogi, Kondo et al. 2007). L'implication de la dérégulation de ce facteur dans la progression des

déficiences cognitives est soutenue par le maintien des fonctions cognitives et de la viabilité neuronale lors de son inhibition dans les modèles animaux (Hunot, Brugg et al. 1997, Wilms, Rosenstiel et al. 2003, Hunot, Vila et al. 2004, Mogi, Kondo et al. 2007, Echeverria, Burgess et al. 2009).

Ces dérégulations des facteurs rédox en font des cibles thérapeutiques privilégiées pour lutter contre la neurodégénérescence et la progression des maladies neurodégénératives (Tufekci, Bayin et al. 2011, Ganesh, Negi et al. 2013, Srinivasan and Lahiri 2015, Lipton, Rezaie et al. 2016).

II.D.e. Apparition précoce du stress oxydatif dans le développement de la Maladie d'Alzheimer et la Maladie de Parkinson

La déclaration clinique de la MA ou de la MP intervient la plupart du temps plusieurs décennies après le début du développement de la maladie. Cela est en partie dû au fait que l'âge soit le premier facteur de risque et que les caractéristiques physiopathologiques existent aussi, dans une moindre mesure, chez les sujets sains. En moyenne, il se passe seulement huit ans entre le diagnostic clinique de la MA et la mort du patient, alors que la neurodégénérescence suit une évolution lente et progressive (Sultana and Butterfield 2010).

Plusieurs évidences montrent que l'apparition du stress oxydatif est un événement précoce dans le développement de la MA ou de la MP. Les marqueurs du stress oxydatif sont présents dès le stade MCI précédent la MA (Nunomura, Perry et al. 2001) (Wang, Markesbery et al. 2006) (Butterfield, Poon et al. 2006) (Singh, Dang et al. 2010) et semble précéder la diminution de la dopamine dans la MP (Sofic, Lange et al. 1992, Bharath and Andersen 2005). Dans un modèle murin de la MP où le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale est inhibé par une diffusion chronique de roténone, l'apparition du stress oxydatif précède la dégénérescence des neurones de la SNpc et l'apparition des corps de Lewi (Nunomura, Moreira et al. 2007).

L'analyse des facteurs de risques montre que le stress rencontré au cours de la vie joue un rôle important dans l'apparition de la maladie à travers la sécrétion de cortisol et la méthylation de certains gènes (Lemche 2018). Plus le stress est vécu tôt au cours de la vie, plus les risques de développer la maladie sont importants. Ces observations sont appuyées *in vivo* où un stress immunitaire en fin de gestation chez les souris les prédispose à développer des pathologies mimant la MA (Krstic, Madhusudan et al. 2012).

L'apparition précoce du stress oxydatif dans la MA et la MP laisse penser qu'il serait une cible fondamentale pour diminuer la progression de la neurodégénérescence responsable de l'apparition des symptômes cliniques et à terme de la mort des patients.

II.E. Traitements actuels

II.E.a. Absence de moyen thérapeutique efficace

La complexité de la pathogenèse, encore mal définie, de la MA et de la MP rend les traitements difficiles. À l'heure actuelle, les traitements se concentrent sur la prise en charge des symptômes et non sur la limitation de la neurodégénérescence.

Les médicaments approuvés pour les patients déclarés cliniquement atteints de la MA sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. En effet, le déficit cholinergique au niveau présynaptique observé chez les patients MA, résultant d'une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase et de la synthèse de l'acétylcholine, est corrélé à des déficiences cognitives (Wilcock, Esiri et al. 1982), (Drachman and Leavitt 1974). Les inhibiteurs de cholinestérase permettent de diminuer la dégradation de l'acétylcholine dans les fentes synaptiques et ainsi de maintenir la neurotransmission cholinergique plus longtemps (Birks 2006).

Concernant la maladie de Parkinson, les traitements visent surtout à compenser la perte de dopamine associée à la mort des neurones dopaminergiques, ou encore à limiter sa dégradation, pour diminuer les symptômes moteurs, à travers l'administration de précurseurs de la dopamine (Jankovic 2008).

D'autres traitements sont actuellement en études cliniques, certains pour réduire les symptômes de manière plus efficace, d'autres ciblant la dégradation de l'amyloïde- β ou de l' α -synucléine et la phosphorylation de la protéine Tau (Oertel 2017, Cao, Hou et al. 2018, Cummings, Lee et al. 2018). Cependant, les multiples dommages induits par le stress oxydatif compliquent fortement la recherche de composés thérapeutiques. Afin de ralentir, ou d'inhiber dans le meilleur des cas, la neurodégénérescence, il convient de rechercher des formulations efficaces pour cibler un ensemble de dysfonctionnements cellulaires impliqués dans la mort des neurones.

II.E.b. Stratégie des antioxydants

L'implication du stress oxydatif dans la neuropathogenèse est indiscutable. À plusieurs reprises, les dysfonctions cellulaires et cognitives ont pu être diminuées voire inhibées grâce à l'usage de composés antioxydants dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de la MA et de la MP. Cependant, ces

résultats ne se confirment pas au niveau clinique. Peu d'études cliniques visant à tester l'efficacité d'un traitement antioxydant dépassent la phase I ou II, et les résultats ne sont pas concluants (Tableau 4). Seule la consommation de resvératrol durant un an semble diminuer les marqueurs inflammatoires chez les patients de type MCI (Moussa, Hebron et al. 2017).

De manière étonnante, peu d'études se sont intéressées à utiliser une combinaison de composés pour cibler les multiples atteintes présentes dans la MA et la MP. Les seuls outils disponibles à l'heure actuelle pour limiter l'apparition et le développement du déclin cognitif sont relatifs aux habitudes de vie et à l'alimentation. De nombreux gènes impliqués dans le vieillissement semblent être modulés dans la réponse de l'organisme face aux différents nutriments, faisant de l'alimentation une potentielle source pour limiter les dommages oxydatifs (Mataix, Ochoa et al. 2004). Un type de diète en particulier, la diète de type Méditerranéenne (MeDi), a montré des propriétés intéressantes sur la santé en général, et la diminution des maladies chroniques. L'étude de la composition de cette diète peut amener des pistes pour développer des complexes préventifs, voire thérapeutiques pour limiter la progression de ces MND.

Tableau 4 : Recherche des études cliniques complétées portant sur les antioxydants, et/ou les polyphénols et la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Source : clinicaltrials.gov.

NCT number	ref	Phase	Fin	Participants	Composés administrés	Durée de l'étude	résultats
NCT00117403	(Galasko, Peskind et al. 2012)	I	2007	77 MCI et MA modéré	Vitamine E, Vitamine C, acide α -lipoïque	16 semaines	Accélération du déclin au test MMSE Diminution isoprostane F-2 dans le CSF Pas de changement des taux d'A β 42, tau, et P-tau(Ser181) dans le CSF
NCT00090402	(Shinto, Quinn et al. 2014)	I	2006	39 MA	Acides gras oméga-3 seuls (ω -3) oméga-3 plus alpha acide lipoïque (ω -3 + LA)	12 mois 12 mois	Pas de différence des niveaux d'isoprostanes F-2 Pas de différence sur les tests ADAS-cog et ADL ω -3 + LA : diminution plus faible (vs placebo) au test MMSE. ω -3 : diminution plus faible (vs placebo) test IAADL.
NCT00678431	(Zhu, Grossman et al. 2018)	III	2010	39 MA	5 g dextrose, 5 g malate, et 5 mg resveratrol	12 mois	Aucune différence sur les tests cognitifs (ADAS-cog, MMSE, ADL)
NCT01320527	(Remington, Bechtel et al. 2016)	II	2012	24 MCI et MA	folate, alpha-tocophérol, B12, S-adenosyl méthionine, N-acetylcystéine, acétyl-L-carnitine	12 mois	Pas de différence cognitive
NCT00099710	(Moussa, Hebron et al. 2017)	II	2014	119 MCI	resvératrol 2g/j	52 semaines	Diminution de MMP9 dans LCR, Augmentation IL-4 et FGF-2 Augmentation de MMP 10 plasmatique, Diminution de IL-12 Atténuation du déclin au test MMSE, Modification des taux d'A β 42 dans le CSF.
				36 MCI et MA	2 ou 4 g / j Curcumin C3 Complex(®)	72 semaines	Dosage CSF : pas de différence entre les groupes
NCT00951834	-	II	2015	21	Mois 1-3: 200 mg EGCG Mois 4-6: 400 mg EGCG Mois 7-9: 600 mg EGCG Mois 10-18: 800 mg EGCG	18 mois	Aucune information disponible
NCT03286608	-	étude observationnelle	2015	1329, 65 ans et +	-	12 ans	Aucune information disponible <i>Obj : Identifier un pattern d'ingestion de polyphénols (basé sur 26 polyphénols flavonoïdes et non-flavonoïdes en utilisant un rappel alimentaire de 24 h) associé au risque de démence et de maladie d'Alzheimer sur 12 ans dans la cohorte 3C de Bordeaux.</i>
NCT00461942	-	II	2011	480, MP déclarée dans les 5 dernières années	EGCG/ECG	-	Aucune information disponible
NCT02818777	-	II	2017	13, MP idiopathique	Cannabidiol 20 mg/kg/j	5 semaines	Résultats non publiés

III. La diète Méditerranéenne pour limiter l'incidence du stress oxydatif et le déclin cognitif

Depuis 2013, la MeDi est reconnue comme héritage de l'Espagne, de la Grèce, de l'Italie, du Maroc, du Portugal, de la Chypre et de la Croatie par l'UNESCO qui l'a inscrite à la Liste Représentative de Patrimoine Culturel et Immatériel de l'humanité.

III.A. Caractéristiques nutritionnelles de la diète Méditerranéenne

L'intérêt particulier pour la Diète Méditerranéenne et son incidence sur la santé remonte à la fin des années 1950, lorsque le Dr. Ancel Keys se lance dans une étude observationnelle entre les habitudes de vie et l'incidence des maladies coronariennes. Il lance « l'étude des sept pays » («Seven Country Study») en 1958 avec pour objectif de comparer le cholestérol sanguin et l'alimentation entre les États-Unis, la Grèce, l'Italie, l'Espagne, l'Afrique du Sud, le Japon et la Finlande. Avec ses collaborateurs, il conclut sur l'existence d'un lien entre l'apport nutritionnel, particulièrement les graisses saturées et l'incidence des maladies cardiaques.

Cette étude a amorcé les études épidémiologiques mettant en évidence la relation entre régime alimentaire, habitudes de vie et apparition de maladies liées à l'âge.

Plusieurs équipes ont travaillé à la définition exacte de la MeDi (Keys, Menotti et al. 1986, Ferro-Luzzi and Branca 1995, Willett, Sacks et al. 1995, Martínez-González Miguel, Gea et al. 2019). Bien qu'il existe un certain débat sur la présence de plusieurs aliments, comme la pomme de terre ou les œufs, ce régime alimentaire est largement caractérisé. Il se compose avant tout d'un apport important en fruits et légumes, les légumineuses et les graines n'étant pas négligées. La consommation de céréales se fait sous forme entière, mais modérée, tout comme une consommation raisonnée d'œufs, de viandes blanches et d'une consommation rare de produits laitiers ou de viandes rouges. Le poisson et le vin rouge sont consommés deux à trois fois par semaine avec modération. La quantité de graisse est inférieure à 30 % de l'énergie calorique et constituée de graisses faiblement saturées (moins de 10 %), principalement représentée par l'huile d'olive. Le ratio acides gras mono-insaturés/saturés est proche de 2,7. La consommation de sucres raffinés est quasi inexistante. Par ailleurs, le mode de cuisson des aliments est aussi à prendre en compte : les aliments doivent être les moins altérés possible tout en améliorant leur digestibilité.

Ce régime alimentaire permet l'ingestion importante d'antioxydants sous la forme de vitamine C, de β -carotène, de tocophérols, et de polyphénols. Les apports en minéraux essentiels sont élevés,

comme pour le calcium, le zinc, le magnésium ou encore le potassium (Keys, Menotti et al. 1986, Willett, Sacks et al. 1995). De plus, la MeDi se caractérise par un régime alimentaire, mais aussi par des habitudes de vie. L'exercice physique régulier fait partie intégrante de ce mode de vie.

La plupart des études observationnelles portant sur l'étude de la relation entre diètes / mode de vie et vieillissement / maladies chroniques utilisent des questionnaires alimentaires basés le plus souvent sur la fréquence de prise alimentaire et calculent un score d'adhérence à la MeDi (Willett 1998, Trichopoulou, Costacou et al. 2003, Panagiotakos, Pitsavos et al. 2006, Schroder, Fito et al. 2011). Bien que ces études puissent comporter des biais, leur multiplication au cours des 20 dernières années et la convergence de leurs résultats permettent assurément d'attribuer des bénéfices pour la santé à ce régime alimentaire.

III.B. Bénéfices pour la santé

Dans les années 1990, Willett W. et al. remarquent que l'espérance de vie était plus importante en Grèce et en Crète que dans le reste du monde (Willett, Sacks et al. 1995). De plus, l'incidence des maladies coronariennes était plus faible, tout comme la prévalence de certains cancers (Willett, Sacks et al. 1995, Trichopoulou, Costacou et al. 2003, Sofi, Cesari et al. 2008, Martinez-Gonzalez and Martin-Calvo 2016).

III.B.a. Augmentation de l'espérance de vie et incidence sur les maladies chroniques

L'étude française de Lyon, « The Lyon Diet Heart Study » est une des premières études cliniques ayant démontré une réduction de 56 % de la mortalité, une diminution de 61 % des risques de cancers et de 70 % des risques de maladies cardio-vasculaires suite à l'adoption d'un régime de type MeDi depuis quatre années (de Lorgeril, Salen et al. 1998). Ces observations ont été confirmées après observation de 1500 personnes âgées européennes (70-90 ans) sur 10 ans («HALE project »). Cette étude démontre une diminution de 60 % de la mortalité toutes causes confondues chez les personnes consommant une diète de type MeDi, une diminution de 61 % des décès liés aux maladies cardio-vasculaires et une diminution de 60% des décès liés aux cancers (Knoops, de Groot et al. 2004).

L'étude interventionnelle PREDIMED ("Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet") a permis de suivre 7 500 personnes présentant un haut risque de maladies cardio-vasculaires (en Espagne) divisées en trois groupes : un groupe suivant une diète de type MeDi enrichie en huile d'olive; un groupe suivant une diète de type MeDi enrichie en noix; un

groupe encouragé à consommer peu de graisses. Après cinq ans de suivi, les deux groupes ayant suivi un régime de type MeDi présentaient une réduction de la mortalité liée aux infarctus et aux accidents cardio-vasculaires, avec une amélioration du statut inflammatoire général (dosage de la protéine C réactive) pour le groupe consommant de l'huile d'olive (Estruch, Martinez-Gonzalez et al. 2006, Estruch, Ros et al. 2013).

L'augmentation de l'espérance de vie tous types de mortalités confondues est soutenue par l'observation des télomères chez des sujets âgés consommant une diète MeDi (une réduction de la taille des télomères étant associée à une diminution de l'espérance de vie). Une diminution de la réduction de la taille des télomères est liée à l'âge chez les sujets Grecques et Italiens, en comparaison des sujets allemands (de Vos-Houben, Ottenheim et al. 2012, Boccardi, Esposito et al. 2013). En parallèle, l'adhésion à la MeDi montre des bénéfices intéressants pour réduire l'obésité (Esposito, Kastorini et al. 2011) et le syndrome métabolique en diminuant le stress oxydatif et l'inflammation postprandiale après seulement 12 semaines d'adhésion (Yubero-Serrano, Lopez-Moreno et al. 2018), ainsi que sur la diminution du risque d'apparition du diabète de type 2 (Salas-Salvadó, Bulló et al. 2011).

Bien que certaines contradictions existent, dans l'ensemble, les bénéfices pour la santé associés à l'adhésion à un régime de type MeDi sont largement reconnus par la communauté scientifique ; à tel point que certains n'hésitent pas à utiliser le terme de « Golden standard prevention » pour limiter le développement des maladies liées à l'âge (Martinez-Gonzalez and Martin-Calvo 2016).

III.B.b. Prévention du déclin cognitif.

L'âge, les maladies cardio-vasculaires, le diabète de type 2 sont des facteurs de risques d'apparition de la MA et de la MP. Le changement des habitudes de vie et des habitudes alimentaires fait partie des facteurs de risques modifiables pour limiter le développement de la MA et de la MP. Or, plusieurs études montrent un gain important de l'adhésion à la diète MeDi pour conserver l'intégrité cérébrale chez les personnes âgées. En effet, une forte adhésion à la MeDi permettrait de réduire de 69 % l'apparition de la MA, de diminuer de 11 % l'évolution des stades MCI vers la MA ou encore de diminuer le déclin cognitif (Scarmeas, Stern et al. 2006, Scarmeas, Luchsinger et al. 2009, Koyama, Houston et al. 2015). Psaltopoulou et al. ont montré que chez les sujets âgés de 60 ans et plus, plus le score d'adhésion à la MeDi était important, plus les scores au test MMSE étaient élevés, et inversement (Psaltopoulou, Kyrozis et al. 2008). Leurs observations ont été confirmées par d'autres études qui témoignent de l'impact positif de la diète

MeDi sur les performances cognitives des personnes âgées (Schroder, Fito et al. 2011, Morris, Tangney et al. 2015, Olsson, Karlstrom et al. 2015, Anastasiou, Yannakoulia et al. 2017). De même, une diminution d'adhésion à la MeDi augmente les risques d'apparition de la MP (Gao, Chen et al. 2007, Alcalay, Gu et al. 2012).

III.C. Cas particulier de l'huile d'olive

Dans les pays méditerranéens, la consommation d'huile d'olive représente une part importante de l'apport en lipides de la population, plus particulièrement en Grèce, avec une consommation moyenne de 54 g/j et par personne. Riche en acides gras mono-insaturés et particulièrement en acide oléique, l'huile d'olive contient entre 3 et 22 % d'acides gras polyinsaturés tels que les acides linoléiques (18:3 n-3) et linoléique (18:3 n-6) (Montserrat-de la Paz, Bermudez et al. 2016). En plus des acides gras, la partie insaponifiable de l'huile d'olive (environ 2 % de sa composition totale) est représentée par plus de 200 composés différents, dont des squalènes, des phénols, des tocophérols et tocotriénols, des composés triterpéniques, des stérols ainsi que du β -carotène (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition de l'huile d'olive.

Adapté de (Yubero-Serrano, Lopez-Moreno et al. 2018) et (Serreli and Deiana 2018).

Fraction saponifiable (98 %)	
	<i>Proportions moyennes</i>
Acide oléique (C18:1)	55 – 83 %
Acide linoléique (C18:2)	3,5 – 21 %
Acide palmitique (C16:0)	7,5 – 20 %
Acide stéarique (C18:0)	0,5 – 5 %
Acide α -linoléique (C18:3)	0,1 – 1,5 %
Fraction insaponifiable	
	<i>Principaux représentants</i>
Tocophérols	α -tocophérol
Phytostérols	β -sistostérol, stigmastérol, comperstérol
Acides triterpéniques	Acide oléanolique
Pigments	Chlorophylles (α - et β -phéophytine)
Caroténoïdes	Lutéine, β -carotène
Composés phénoliques	Sécoiridoïdes, phénylétanoïdes, acides phénoliques

III.C.a. L'or de la Diète MeDi

Dès les conclusions de l'étude des « seven-country », Keys et al. concluent sur l'importance de l'huile d'olive dans les résultats de l'étude où ils démontrent que les décès liés aux maladies

cardiaques, toutes causes confondues, étaient moins importants dans les populations consommant régulièrement de l'huile d'olive comme source principale de graisse (Keys, Menotti et al. 1986). Les bénéfices pour la santé de la consommation d'huile d'olive sont de plus en plus étudiés depuis les années 1990 et présentent un intérêt majeur. À tel point que l'EFSA (European Food Safety Authority) a accordé des allégations santé pour l'huile d'olive concernant ses effets bénéfiques sur le maintien d'une cholestérolémie normale, la protection des lipides sanguins et des cellules contre le stress oxydatif, ainsi que le maintien d'une coagulation sanguine normale (1924/2006 2006).

Au-delà de la diète MeDi, la consommation d'huile d'olive extra-vierge (EVOO) a montré des bénéfices importants pour limiter le développement de nombreuses pathologies, notamment des maladies chroniques. En effet, la consommation régulière d'huile d'olive a été corrélée à une diminution de risques d'apparition des maladies cardio-vasculaires (Estruch, Martinez-Gonzalez et al. 2006), à une amélioration de la fonction endothéliale (Yubero-Serrano, Lopez-Moreno et al. 2018) et du métabolisme du glucose. Les patients atteints de diabète de type 2 voient leur hémoglobine glyquée diminuée suite à une diète de type MeDi riche en EVOO par comparaison à une diète de type MeDi faible en graisses (Hodges and Minich 2015). De plus, la consommation d'huile d'olive a été largement associée à une diminution des marqueurs de stress oxydatif dans le plasma humain, à une augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes, et à une diminution des lésions induites par le stress oxydatif lié à l'âge (Quiles, Ochoa et al. 2004, Oliveras-López, Berná et al. 2014).(Fernández del Río, Gutiérrez-Casado et al. 2016, Yubero-Serrano, Lopez-Moreno et al. 2018).

III.C.b. Amélioration des fonctions cognitives

Plusieurs études cliniques ont démontré l'intérêt de la consommation d'huile d'olive pour prévenir ou limiter la diminution des fonctions cérébrales, la plus importante d'entre elles étant l'étude des 3-C (« the three City Study ») (Tableau 6) (Solfrizzi, D'Introno et al. 2005, Solfrizzi, Colacicco et al. 2006)((Berr, Portet et al. 2009, Samieri, Feart et al. 2011, Martinez-Lapiscina, Clavero et al. 2013, Pelletier, Barul et al. 2015, Valls-Pedret, Sala-Vila et al. 2015).

L'amélioration des troubles cognitifs engendrée par la consommation d'huile d'olive a d'abord été attribuée à la consommation des acides gras contenus dans l'huile, notamment la consommation d'acides gras insaturés (Solfrizzi, D'Introno et al. 2005, Solfrizzi, Colacicco et al. 2006)((Berr, Portet et al. 2009, Samieri, Feart et al. 2011). La consommation d'acides gras mono-insaturés

(comme l'acide oléique), moins sensible à l'oxydation que les acides gras polyinsaturés (acides linoléique et linolénique), pourrait participer à la diminution de l'oxydation des membranes cellulaires (Mataix, Ochoa et al. 2004).

Cependant, l'huile d'olive possède aussi des composés phénoliques particuliers. Chez des souris âgées, la consommation d'huile d'olive riche en composés phénoliques pendant un an, par comparaison avec la consommation d'une huile d'olive dépourvue en ces composés, a permis une amélioration de la mémoire contextuelle, une diminution des déficits moteurs et une diminution de la peroxydation lipidique dans le cérébellum (Pitozzi, Jacomelli et al. 2012). Une telle supplémentation montre une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le vieillissement, et à l'inverse une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique dans le cortex de souris de 10 mois (Luceri, Bigagli et al. 2017).

Chez l'humain, plusieurs études ont mis en avant l'importance de la consommation des composés phénoliques de l'huile d'olive par comparaison à la diversité de l'apport en composés phénoliques que représente un régime de type MeDi. Par exemple, l'étude PREDIMED-NAVARRA montre de meilleurs résultats aux tests MMSE chez les sujets ayant consommé des aliments riches en composés phénoliques représentatifs la diète MeDi par rapport au groupe contrôle, mais c'est la consommation d'huile d'olive plus particulièrement qui a été corrélée à une amélioration de la mémoire verbale immédiate (Valls-Pedret, Lamuela-Raventos et al. 2012). Les composés phénoliques particulièrement issus de l'huile d'olive représentent 90,4 mg d'apport journaliers dans le cadre de la MeDi, soit 11 % de la consommation totale de composés (Carluccio, Calabriso et al. 2015). Or, Konstantinidou et al. démontrent l'impact particulier des composés phénoliques de l'huile d'olive sur l'expression des facteurs pro-inflammatoires. En effet, en comparant la consommation d'une diète MeDi avec de l'huile d'olive, ils ont pu observer une diminution significative de l'expression des facteurs pro-inflammatoires chez les sujets consommant l'huile d'olive riche en composés phénoliques par comparaison aux sujets consommant une huile d'olive pauvre en composés phénoliques (Konstantinidou, Covas et al. 2010). De même, chez les sujets atteints d'un syndrome métabolique, la consommation d'huile d'olive riche en composés phénoliques (398 mg/kg) est plus efficace pour modifier l'expression des gènes impliqués dans les processus pro-inflammatoires, notamment le facteur Nf-kB, par comparaison à une consommation d'huile d'olive pauvre en composés phénoliques (70 mg/kg) (Perez-Martinez, Lopez-Miranda et al. 2007).

Tableau 6 : Études cliniques portant sur la consommation d'huile d'olive et les troubles cognitifs.

MMSE : mini mental state examination ; EVOO : extra virgin olive oil.

Étude	Participants	Comparaison	Principaux résultats	Ref.
Étude des 3-C (three City study)	6947 personnes > 65 ans Suivie sur 3 ans	Consommation d'huile d'olive modérée ou intense vs consommation plus faible voire nulle	↓ risques d'apparitions de déficits cognitifs ↓ troubles verbaux ↓ troubles de la mémoire visuelle ↓ facteurs de risques de vieillissement cérébral	((Berr, Portet et al. 2009)).
Étude PREDIMED-NAVARRA	522 participants ≈ 75 ans, suivis sur 6,5 ans	MeDi + EVOO vs MeDI	↑ des fonctions cognitives globales ↑ de la vue ↑ de la mémoire ↑ du score MMSE	(Martinez-Lapiscina, Clavero et al. 2013)
Étude PREDIMED-Barcelona	447 participants ≈ 67 ans, suivis sur 6 ans	MeDi + EVOO (1 L / semaine) vs MeDI	↑ des fonctions cognitives globales ↑ de fonctions du cortex frontal (attention et fonction exécutive) ↑ de la mémoire	(Valls-Pedret, Sala-Vila et al. 2015)
Italian Longitudinal Study on Aging	704 participants, 65-84 ans, suivis sur 8,5 ans.	EVOO 46 g/jour	↑ du score MMSE ↓ du risque cardiovasculaire	(Solfrizzi, Colacicco et al. 2006)

Par ailleurs, plusieurs études animales montrent une diminution de l'agrégation de l'A β , de l' α -synucléine et de la protéine Tau, ainsi qu'une diminution des marqueurs de stress oxydatif suite à l'administration de composés phénoliques issus de l'huile d'olive (Jemai, El Feki et al. 2009, Daccache, Lion et al. 2011, Monti, Margarucci et al. 2012, Abuznait, Qosa et al. 2013, Pourkhodad, Alirezai et al. 2016, Palazzi, Bruzzone et al. 2018). Chez le nématode *C. elegans* traité avec du paraquat, un herbicide suspecté d'induire l'apparition de la MP, l'augmentation de la durée de vie induite par l'administration de l'huile d'olive a été attribuée à la présence du tyrosol et de l'hydroxytyrosol, deux des principaux composés phénoliques présents dans l'huile d'olive (Rossi, Caruso et al. 2017).

Dans le cadre d'un régime de type MeDi, l'apport en hydroxytyrosol atteint 0,1 mg/kg/j, soit 7 mg pour une personne de 70 kg (Kotronoulas, Pizarro et al. 2013). Pour un apport de 25 à 50 mL d'huile d'olive, De La Torre et al ont estimés que 9 mg de composés phénoliques étaient ingérés, dont au moins 1 mg correspondant au tyrosol et à l'hydroxytyrosol, et 8 mg correspondant à l'oleuropéine et ses dérivés (de la Torre 2008).

L'implication des composés phénoliques dans les bénéfices pour la santé attribués à l'huile d'olive a été rendue officielle par l'Efsa en 2012, qui a autorisé l'allégation santé « Les polyphénols présents dans l'huile d'olive contribuent à protéger les lipides sanguins contre le stress oxydatif » (1924/2006 2006).

IV. Les polyphénols au service de la stratégie des antioxydants

IV.A. Généralités

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes présents dans tout le règne végétal. Différentes classes de composés phénoliques sont apparues au cours de l'évolution, notamment pour répondre à divers stress biotiques et abiotiques. Les différents environnements ont largement contribué à augmenter le nombre de polyphénols produits par les plantes. Ils sont retrouvés dans tous les types de tissus végétaux : écorces, feuilles, tiges, fleurs, fruits, racines. Certains ont des rôles structuraux dans les parois cellulaires végétales (Bidlack, Malone et al. 1992) alors que d'autres ont des rôles de défenses, de pigmentations et/ou participent à leur saveur et sont présents dans les vacuoles végétales (Quideau, Deffieux et al. 2011, Dierkes, Krieger et al. 2012, Le Deun, Van der Werf et al. 2015).

Un composé phénolique est une molécule qui contient au moins un noyau phénol (Figure 11), c'est-à-dire un noyau aromatique de type benzène (C₆H₆) avec une fonction hydroxyle, en plus d'autres substituants. Cette famille de composés présente une très grande diversité de structures

(plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (Quideau, Deffieux et al. 2011)), allant des simples monophénols (un noyau aromatique avec une seule fonction hydroxyle), des *para*- ou *ortho*-diphénols (un noyau aromatique avec deux fonctions hydroxyles), à des structures plus complexes tels que les flavonoïdes, les stilbènes, jusqu'aux tanins fortement polymérisés (Figure 12).

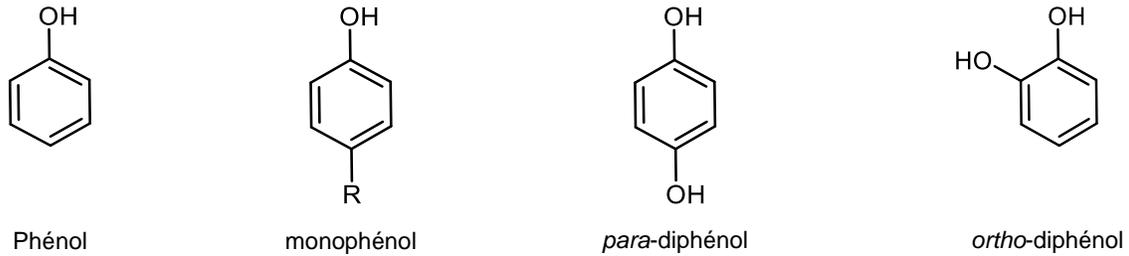


Figure 11 : Structure de base des composés phénoliques.

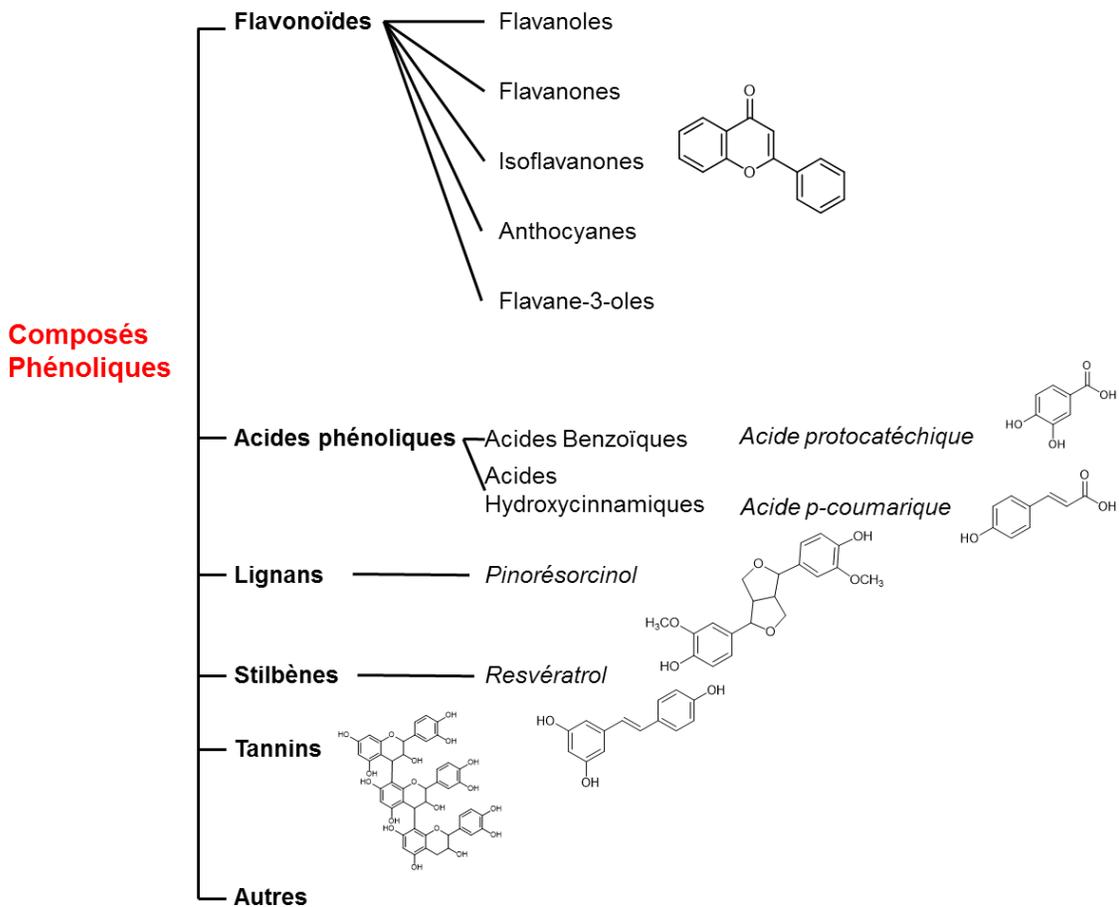


Figure 12: Classification des composés phénoliques.
Adaptée de (Austermann, Baecker et al. 2019)

Le terme polyphénols est employé pour désigner les composés phénoliques. Cependant, d'un point de vue lexical, il est utile de préciser que le terme polyphénol est un abus de langage. D'après la définition proposée en 1994 par White-Bate-Smith-Swain-Haslam (WBSSH) le terme « polyphénols » (ou polyhydroxyphénols) renvoie à une famille de composés caractérisés par la présence de plusieurs unités phénoliques oligomérisées. Cette stricte définition n'englobe que les composés tanniques tels que les proanthocyanidines, les gallo- et ellagitannins et enfin les phlorotanins. Afin d'élargir le nombre de composés inclus sous ce terme, Quideau S. et al. ont proposé une définition plus étendue :

« The term "polyphenol" should be used to define plant secondary metabolites [...] featuring more than one phenolic ring and being devoid of any nitrogen-based functional group in their most basic structural expression. » (Quideau, Deffieux et al. 2011).

Cette définition englobe les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes. Sont exclus de cette définition tous les composés ne présentant qu'un seul groupe phénolique, quel que soit leur nombre de fonctions phénols. Pour ces derniers, le terme de « composés phénoliques » est conservé.

Suite à ces précisions, ce document se basera sur la définition proposée par S. Quideau et al. pour désigner les différents composés.

IV.B. Focus sur les composés phénoliques de l'huile d'olive

IV.B.a. Composition générale

La fraction phénolique de l'huile d'olive représente une faible portion de sa composition chimique totale, entre 200 et 500 mg/kg (Boskou, Blekas et al. 2005, Omar 2010). Les composés phénoliques sont responsables de son goût et de sa qualité (Servili and Montedoro 2002) (García-González, Aparicio-Ruiz et al. 2008). C'est d'ailleurs sur la base de sa composition en composés phénoliques que repose l'allégation santé de l'huile d'olive accordée par (Efsa Panel on Dietetic Products and Allergies 2012). Cette allégation est attribuée uniquement pour les huiles qui contiennent au moins 5 mg d'hydroxytyrosol et ses dérivés pour 20 g d'huile d'olive.

La composition phénolique de différentes EVOO issues de plusieurs régions méditerranéennes varie en fonction du climat, du sol, du type de récolte et du degré de maturité des olives (Romero, Brenes et al. 2002), mais les proportions des différents composés phénoliques restent relativement stables dans les EVOO fraîchement extraites. Jusqu'à 36 composés phénoliques ont

été identifiés dans l'huile d'olive (Cicerale, Conlan et al. 2008). Les plus abondants sont les secoiridoïdes comme l'oleuropéine (OLE), qui peut atteindre jusqu'à 14 % de la matière sèche dans les fruits, et ses dérivés comme l'oléocanthal ou encore le verbascoside. En seconde position viennent les alcools phénoliques comme le tyrosol (Tyr) et l'hydroxytyrosol (OH-Tyr). La classe des flavonoïdes est représentée par la présence de lutéoline et d'apigénine. Enfin, en plus faible proportion on retrouve des acides hydroxycinnamiques comme l'acide *para*-coumarique ou l'acide cinnamique, ainsi que des dérivés de ligstrosides (Tableau 7) (Visioli, Galli et al. 2000, Cicerale, Conlan et al. 2008) (Rodriguez-Morato, Boronat et al. 2016).

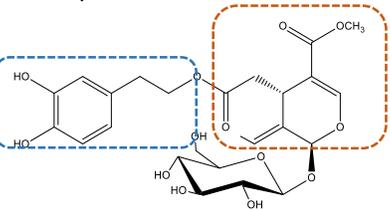
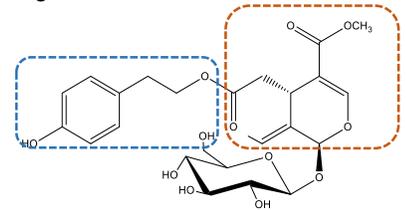
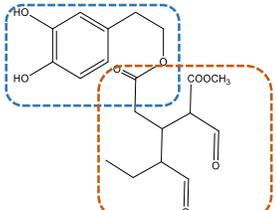
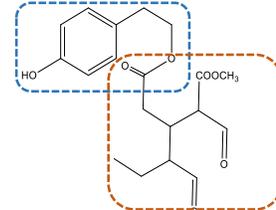
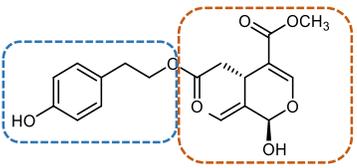
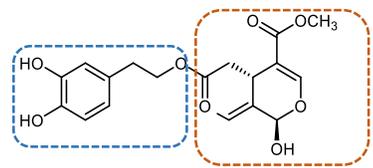
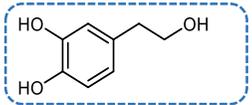
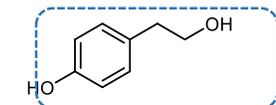
Plusieurs composés sont directement issus de la dégradation de l'oleuropéine ou du ligstroside, durant la fabrication ou le stockage de l'huile, comme leurs dérivés aglycones ou encore l'hydroxytyrosol et le tyrosol respectivement. L'extraction des composés phénoliques est aussi une source de variation dans la composition. Les analyses par HPLC (*high pressure liquid chromatography*) sont majoritairement utilisées pour identifier les pics relatifs aux différents composés. Cependant, l'absence de standardisation des méthodes associée à l'existence d'isomères ou d'absence de standards commerciaux peuvent conduire à des identifications approximatives, voire erronées. L'amélioration de la préparation des échantillons et l'utilisation de techniques de spectrométrie de masse permettent cependant de définir de plus en plus précisément les compositions en composés phénoliques des huiles d'olive.

IV.B.a. Bénéfices pour la santé – antioxydants

Les composés phénoliques de l'huile d'olive sont largement suspectés de contribuer aux améliorations de la santé constatées après une consommation régulière d'huile d'olive. Leur structure leur permet d'avoir une action antioxydante limitant ainsi l'attaque des macromolécules cellulaires et les dommages associés (les mécanismes antioxydants des composés phénoliques sont détaillés au paragraphe IV.C.a, p.84). Cette activité antioxydante est potentiellement à l'origine de leurs vastes activités biologiques dans le cadre de pathologies comme le diabète, les maladies cardio-vasculaires, les cancers et les maladies neurodégénératives où le stress oxydatif est fortement présent. De plus ils peuvent agir directement sur des voies de signalisation cellulaires à travers une action directe sur des enzymes, des récepteurs, sur des protéines ou à travers une modification de l'homéostasie cellulaire (Rossi, Caruso et al. 2017). Les capacités antioxydantes des composés phénoliques de l'huile d'olive ont été confirmées chez l'humain par une diminution de l'excrétion des marqueurs du stress oxydatif suite à l'ingestion de ces composés (Visioli, Caruso et al. 2000).

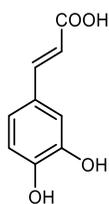
Tableau 7 : Principales classes de composés phénoliques présents dans l'huile d'olive et leurs représentants principaux.

En bleu sont encadrés les structures de type tyrosol (dont hydroxytyrosol), en rouge les structures de type sécoiridoïdes (dérivées de l'acide élénolique). Adapté de (Cicerale, Conlan et al. 2008) et (Rodriguez-Morato, Boronat et al. 2016).

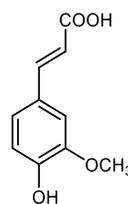
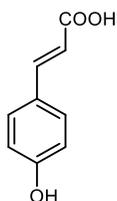
Classes des composés phénoliques	Composés, structures et formules chimiques		
Dérivés sécoiridoïdes	<p>Oleuropéine</p>  <p>Formule brute: $C_{25}H_{32}O_{13}$</p>	<p>Ligstroside</p>  <p>Formule brute: $C_{25}H_{32}O_{12}$</p>	
	<p>Oleuropéine aglycone dialdéhydrique</p>  <p>Formule brute: $C_{19}H_{24}O_8$</p>	<p>Ligstroside aglycone dialdéhydrique</p>  <p>Formule brute: $C_{19}H_{24}O_7$</p>	
	<p>Ligstroside aglycone</p>  <p>Formule brute: $C_{19}H_{22}O_7$</p>	<p>Oleuropéine aglycone</p>  <p>Formule brute: $C_{19}H_{22}O_8$</p>	
	Alcools phénoliques	<p>Hydroxytyrosol</p>  <p>Formule brute: $C_8H_{10}O_3$</p>	<p>Tyrosol</p>  <p>Formule brute: $C_8H_{10}O_2$</p>

Acides phénoliques

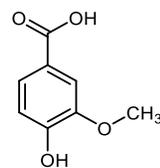
Acide caféique

Formule brute: $C_9H_8O_4$

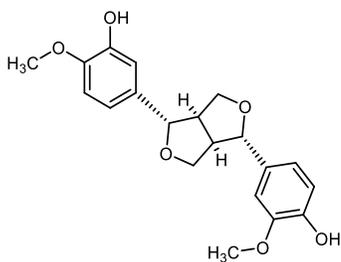
Acide férulique

Formule brute: $C_{10}H_{10}O_4$ Acide *p*-coumariqueFormule brute: $C_9H_8O_3$

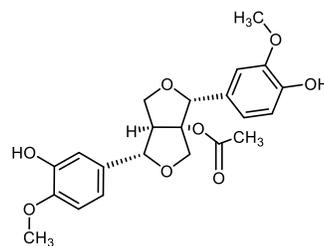
Acide vanillique

Formule brute: $C_8H_8O_4$ **Lignanes**

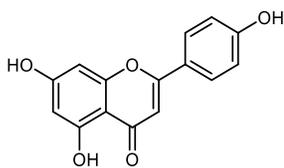
Pinorésinol

Formule brute: $C_{20}H_{22}O_6$

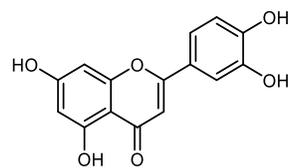
Acétoxy-pinorésinol

Formule brute: $C_{22}H_{24}O_8$ **Flavonoïdes**

Apigénine

Formule brute: $C_{15}H_{10}O_5$

Lutéoline

Formule brute: $C_{15}H_{10}O_6$

En effet, dans un système *in vitro*, l'oleuropéine et son dérivé l'hydroxytyrosol permettent de limiter la peroxydation lipidique (Roche, Dufour et al. 2005, Giordano, Dangles et al. 2015) plus efficacement que le trolox, la vitamine E ou l'alcool homovanillique, des antioxydants reconnus (Umeno, Takashima et al. 2015). Du fait de sa forte activité antioxydante, l'hydroxytyrosol a été un des premiers composés phénoliques de l'huile étudiés (Tableau 8). Plusieurs auteurs l'ont caractérisé comme étant l'antioxydant le plus puissant de l'huile d'olive, notamment par sa capacité à piéger les ROS, particulièrement le radical hydroxyle ROO• et à stopper la peroxydation lipidique à travers son oxydation en quinone (Visioli and Galli 1998, Rietjens, Bast et al. 2007, José G. Fernández-Bolaños 2012). De plus, une augmentation de GSH plasmatique a été observée *in vivo* après consommation d'hydroxytyrosol (Kotronoulas, Pizarro et al. 2013).

L'oleuropéine qui possède une moitié hydroxytyrosol montre des capacités antioxydantes similaires. Dans les systèmes biologiques, ces deux composés sont largement reconnus comme des actifs antioxydants majeurs. L'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont capables d'améliorer le statut rédox des cellules neuronales traitées avec une toxine pro-oxydante, ce qui se traduit par une diminution de la mort des cellules et une diminution des marqueurs de stress oxydatif, notamment à travers l'activation de facteurs antioxydants Nrf2 et l'inhibition du facteur Nf-κB (St-Laurent-Thibault, Arseneault et al. 2011, Pasban-Aliabadi, Esmaeili-Mahani et al. 2013, Peng, Zhang et al. 2015, Sun, Wang et al. 2017). Ces résultats sont retrouvés *in vivo* où la capacité antioxydante plasmatique est augmentée chez les rats après ingestion d'hydroxytyrosol (Visioli, Caruso et al. 2001), ainsi que la résistance oxydative des cellules neuronales chez la souris (Schaffer, Podstawa et al. 2007). De même, chez des animaux transgéniques exprimant certaines caractéristiques physiopathologiques de la MA (souris APP/PS1), l'administration d'hydroxytyrosol améliore le statut antioxydant à travers l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes, améliore les fonctions mitochondriales, diminue les marqueurs de l'inflammation (Peng, Hou et al. 2016). L'oleuropéine et l'oléocanthal ont aussi montré des effets anti-inflammatoires à travers une inhibition dose-dépendante des cyclo-oxygénases (enzymes impliquées dans l'inflammation) (Cornwell and Ma 2007, Yubero-Serrano, Lopez-Moreno et al. 2018).

Les composés mono phénoliques de l'huile d'olive (qui contiennent une seule fonction hydroxyle sur le noyau benzénique) présentent une capacité antioxydante moins importante que celles des composés *ortho*-diphénoliques. Par comparaison à une quinzaine d'autres composés de type acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide caféique, acide sinapique), dérivés benzène

(vanilline, alcool vanillyle, alcool veratryle, veratraldéhyde, pyrogallol) ou dérivés acide benzoïque (acide protocatéchuique, acide gallique, acide vanillique) l'acide *p*-coumarique s'est montré le moins efficace pour piéger le radical DPPH•, ABTS••, ou encore l'anion superoxyde (Mathew, Abraham et al. 2015). Il a cependant montré des capacités intéressantes pour piéger le radical hydroxyle OH• et pour limiter la peroxydation lipidique des oméga-3 à travers l'élimination de l'hydroperoxyde (HOO•) (Espinosa, Inchingolo et al. 2015, Mathew, Abraham et al. 2015). Tout comme l'acide *p*-coumarique, le tyrosol possède de faibles capacités antioxydantes. Là où l'hydroxytyrosol est capable d'inhiber la peroxydation des lipoprotéines *in vitro*, le tyrosol est moitié moins efficace (Di Benedetto, Vari et al. 2007). Son efficacité à piéger le radical DPPH• est inférieur à celle de l'acide *p*-coumarique (Allouche, Sayadi et al. 2004), et sa capacité à piéger le radical ABTS•• est relativement faible (Benavente-Garciaa, Castillo et al. 2000, Mateos, Trujillo et al. 2008, Madrona, Pereira-Caro et al. 2011).

Cependant, ces composés présentent des propriétés biologiques intéressantes. L'acide *p*-coumarique peut réguler les enzymes antioxydantes comme la SOD ou la catalase chez le rat, induisant une protection contre les maladies cardio-vasculaires (Abdel-Wahab, El-Mahdy et al. 2003). De même, l'acide *p*-coumarique améliore le métabolisme du glucose et possède des effets anti-inflammatoires *in vivo* (Pragasam, Venkatesan et al. 2013, Yoon, Youn et al. 2014) (Pei, Ou et al. 2016). Le tyrosol possède aussi des propriétés intéressantes pour lutter contre le stress oxydatif dans les systèmes biologiques, pour lutter contre les cancers, pour prévenir les dysfonctions endothéliales et pour le maintien d'une glycémie adéquate, réduisant l'incidence du diabète de type 2, ainsi que des propriétés anti-inflammatoires (Di Benedetto, Vari et al. 2007, Loru, Incani et al. 2009, Chandramohan, Pari et al. 2015). Le traitement des monocytes humains avec du tyrosol diminue la production de cytokines induites avec du LPS (Bertelli, Migliori et al. 2002). Récemment, une étude a mis en évidence une interaction inhibitrice entre le tyrosol et la Cox 2, ce qui confirme un effet anti-inflammatoire (Yadav, Kumar et al. 2019). De plus, l'administration de tyrosol au nématode *C. elegans* permet une augmentation de son espérance de vie à travers une augmentation de la résistance au stress oxydatif (Canuelo, Gilbert-Lopez et al. 2012).

Les propriétés biologiques des composés phénoliques de l'huile d'olive sont nombreuses. En plus de leurs effets périphériques, ils s'avèrent qu'ils démontrent un fort potentiel neuroprotecteur.

Tableau 8 : Capacités antioxydantes *in vitro* du tyrosol, de l'acide *p*-coumarique, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine.

	Tyrosol		Hydroxytyrosol		Oleuropéine		Acide <i>p</i> -coumarique	
	Résultats	Mesures	Résultats	Mesures	Résultats	Mesures	Résultats	Mesures
DPPH	66.09 µM	Cl ₅₀ 0.15 mM, incubation 30 min ¹	20.51 µM	SC ₅₀ Capacité de piégeage	25.22 µM	SC ₅₀ Capacité de piégeage ²	9.0 ± 3.3 %	% de piégeage ³
	0.76 ± 0.05 ppm	Équivalent Trolox (Tyr 218 ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	3.69 µM	IC ₅₀ (DPPH 0.15mM) ¹	6.11 ± 0.12 ppm	Équivalent Trolox (Ole 218 ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	<10 %	% DPPH* piégé ⁵
	0.18 ± 0.01 ppm	Équivalent Trolox (Tyr 50 ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	26.23 ± 0.56 ppm	Équivalent Trolox (OHT 218 ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	1.54 ± 0.03 ppm	Équivalent Trolox (Ole 50 ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	68.75 µM	Cl ₅₀ 0.15 mM ¹
			5.03 ± 0.10 ppm	Équivalent Trolox (OHT 50ppm ; DPPH 100 µM) ⁴	44 ± 3 %	% DPPH* piégé (Ole 10 µM ; DPPH 100 µM) ⁶	3 ± 2 %	% DPPH* piégé (<i>p</i> -Cou 10 µM ; DPPH 100 µM) ⁶
			47 ± 3 %	% DPPH* piégé (OHT 10 µM ; DPPH 100 µM) ⁶	5.18 ± 0.11 µg/mL	SC50 (µg/mL) DPPH ⁷		
				11.12 µg/mL	Cl ₅₀ DPPH ⁸			
ORAC	0.83 ± 0.03 µM	Équivalent Trolox / µM Tyrosol ⁹	1.92 ± 0.04 mM	Équivalent Trolox ¹⁰			7.4 ± 0.4 µM	Équivalent Trolox ³
	0.79 ± 0.04	µmol Trolox/ µmol composé testé ¹¹						
FRAP	0.31 ± 0.03 mM	Équivalent Trolox ¹¹	1.39 ± 0.05 mM	Équivalent Trolox mmol Trolox/L ¹²				

	0.31 ± 0.03 mM	Équivalent Trolox mmol Trolox/L ¹²	0.87 ± 0.02 mM	Équivalent Trolox ¹³				
ABTS ^{•+}	0.39 ± 0.01 mM	Équivalent Trolox ¹¹	0.37 ± 0.01	Équivalent Trolox mmol Trolox/L. ¹²	3.61 ± 0.09 µg/mL	SC50 (µg/mL) ABTS ⁷	< 20%	% ABTS ^{•+} piégé ⁵
	0.84 ± 0.02 mM	Équivalent Trolox mmol Trolox/L ¹²	0.49 ± 0.01 mM	Équivalent Trolox ¹³	0.88 ± 0.09 mM	Ole 50 µM ¹⁴		
	0.35 ± 0.05 mM	Équivalent Trolox ¹⁴	1.57 ± 0.12	OHT 50 µM ¹⁴	97,2 %	% piégeage ABTS ^{•+} à 20µg/ml d'oleuropéine ⁸		
				0.94 ± 0.01 mM	Équivalent Trolox (mM) ¹⁵	0.94 ± 0.08 mM	Équivalent Trolox (mM) ¹⁵	9.96 µg/mL
Hydroxyl radical scavenging activity	2.51 mM	Cl ₅₀ (mM) hydroxylation de l'acide salicylique par HO [•] ¹⁶	1.34 mM	Cl ₅₀ (mM) hydroxylation de l'acide salicylique par HO [•] ¹⁶	7.8 mM	Cl ₅₀ (mM) hydroxylation de l'acide salicylique par HO [•] ¹⁶	≥ 98%	% HO [•] piégé (p-Cou 10 µM) ⁵
							2.33 mM	Cl ₅₀ (mM) hydroxylation de l'acide salicylique par HO [•] . ¹⁶
Superoxide scavenging activity					≥ 50%	% de piégeage d'O ₂ ^{•-} Ole 1,9 mM µM ⁸	≤ 105 %	% de piégeage d'O ₂ ^{•-} p-cou 15 µM ⁵

Hydrogen peroxide scavenging capacities		≥ 30%	% de piégeage de H ₂ O ₂ Ole 1,9 mM μM ⁸
Lipid peroxidation	4.22 ± 0.13 μM	4.03 ± 0.26 μM	IC ₅₀ AAPH 0.25mM Ole 0.75 μM ¹⁵

1.(Allouche, Sayadi et al. 2004) ; 2.(Saija, Trombetta et al. 1998); 4.(Carrasco-Pancorbo, Cerretani et al. 2005); 5.(Mathew, Abraham et al. 2015); 6.(Stupans, Kirlich et al. 2002); 7.(Toth, Barabas et al. 2016); 8.(Gülçin I., Elias R. et al. 2009) ; 9.(Garcia-Padial, Martinez-Oharriz et al. 2013) ; 10.(Trujillo, Gallardo et al. 2014) ; 11.(Madrona, Pereira-Caro et al. 2011) ; 12.(Mateos, Trujillo et al. 2008) ; 13.(Fernandez-Pastor, Fernandez-Hernandez et al. 2016) ; 14.(Benavente-Garciaa, Castillo et al. 2000) ; 15.(Paiva-Martins, Gordon et al. 2003); 16.(Owen R. W., Mier et al. 2000).

IV.B.b. Effets neuroprotecteurs

De nombreuses études ont observé les effets bénéfiques des composés phénoliques de l'huile d'olive pour limiter la mort de neurones dans des modèles *in cellulo* mais aussi *in vivo*. Ils permettent notamment l'inhibition de l'agrégation de l'A β , de l' α -synucléine ou de la protéine Tau, et inhibent de la toxicité de toxines utilisées pour mimer les caractéristiques cellulaires de la MA et de la MP (le plus souvent reliées à la génération d'un stress oxydatif important). La régulation de certains facteurs cellulaires est engagée, et contribue à une amélioration du statut rédox des cellules et une limitation des dommages oxydatifs.

Le tyrosol et l'hydroxytyrosol permettent de limiter la génération de stress oxydatif induit par le paraquat et la toxicité associée chez *C. elegans* (Rossi, Caruso et al. 2017), alors que l'administration d'oleuropéine diminue la mort des neurones de la *Substantia nigra* chez le rat, ainsi que les marqueurs du stress oxydatif (Sarbishegi, Mehraein et al. 2014) et augmente les performances cognitives des souris triples transgéniques utilisées pour l'étude de la MA (3xTg) (Pantano, Luccarini et al. 2017). L'ingestion d'oleuropéine (10, 15 ou 20 mg / kg de poids corporel) 10 jours avant (Pourkhodadad, Alirezaei et al. 2016) (Alirezaei, Rezaei et al. 2017) ou après (injection intrapéritonéale de 100 mg / kg de poids corporel) (Lee, Shim et al. 2018) induction d'un stress qui altère les fonctions de l'hippocampe, permet un maintien des fonctions cognitives, une diminution de la peroxydation lipidique et un maintien de l'expression du facteur neurotrophique chez le rat (Pourkhodadad, Alirezaei et al. 2016, Alirezaei, Rezaei et al. 2017, Lee, Shim et al. 2018). De plus, l'ingestion d'oleuropéine (50 mg / kg de poids corporel) durant huit semaines permet une diminution de l'activité microgliale et astrocytaire, ce qui démontre une diminution de l'activité inflammatoire au niveau cérébral (Grossi, Rigacci et al. 2013, Park, Min et al. 2017).

L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol ont par ailleurs montré des capacités à inhiber l'agrégation de l'A β *in vitro* (Bazoti, Bergquist et al. 2006, Stefania, Valentina et al. 2011, Kostomoiri, Fragkouli et al. 2013), mais aussi à en limiter l'apparition *in vivo* ou à en augmenter la clairance (Grossi, Rigacci et al. 2013, Kostomoiri, Fragkouli et al. 2013). De plus, l'oleuropéine limite aussi l'agrégation de l' α -synucléine (Palazzi, Bruzzone et al. 2018, Mohammad-Beigi, Aliakbari et al. 2019) et de la protéine Tau (Daccache, Lion et al. 2011).

Les monophénols possèdent aussi des propriétés neuroprotectrices intéressantes en vue de limiter la progression de la MA ou de la MP. En effet, l'acide *p*-coumarique et le tyrosol protègent les cellules neuronales primaires contre la toxicité de la 6-OH-dopamine. L'effet neuroprotecteur induit par ces deux monophénols est égal ou supérieur à celui induit par la catéchine ou

l'épicatéchine qui font référence dans le monde des antioxydants phénoliques (Vauzour, Corona et al. 2010). Le tyrosol est capable de limiter la mort des neurones soumis au MPP+, une toxine mimant les caractéristiques cellulaires de la MP, en régulant l'expression des SOD et en diminuant les dysfonctions mitochondriales (Dewapriya, Himaya et al. 2013). De plus le tyrosol et l'acide *p*-coumarique diminuent la toxicité de l'A β en inhibant l'activation du facteur Nf-kB (St-Laurent-Thibault, Arseneault et al. 2011), (Yoon, Youn et al. 2014). L'acide *p*-coumarique permet un maintien des fonctions cognitives chez les souris dont l'hippocampe est soumis à la toxicité de la scopolamine, une drogue anticholinergique (Kim, Lee et al. 2017). Les activités biologiques des monophénols de l'huile d'olive comme le tyrosol ou l'acide *p*-coumarique démontrent que l'activité antioxydante relative à la fonction phénol n'est pas un facteur limitant pour leurs propriétés neuroprotectrices. Cela sous-entend que les capacités antioxydantes dans le sens de « capacités de piégeage des radicaux » ne sont pas l'unique mécanisme mis en jeu.

Beaucoup d'études suggèrent les propriétés antioxydantes et neuroprotectrices des composés phénoliques de l'huile d'olive. Ces travaux permettent de considérer ces composés phénoliques comme de potentiels candidats pour limiter la progression de la MA et de la MP. De plus, les effets biologiques et neuroprotecteurs des composés phénoliques de l'huile d'olive sont possibles, car ces composés sont relativement bien absorbés par l'organisme et sont même capables, dans une certaine mesure, de traverser la barrière hématoencéphalique. Cependant, il a été montré à plusieurs reprises que ces composés sont plus ou moins métabolisés par l'organisme. Les paragraphes suivants décrivent succinctement la biodisponibilité et les transformations métaboliques connues relatives à ces composés.

IV.B.c. Biodisponibilité

Absorption et métabolisme

Quels que soient les composés étudiés dans un but préventif ou thérapeutique, leur disponibilité biologique, encore appelée biodisponibilité doit être positive. C'est pourquoi depuis plusieurs années la biodisponibilité des composés phénoliques de l'huile d'olive a été étudiée.

Absorption

Visioli et al. sont les premiers auteurs à avoir évalué la biodisponibilité du tyrosol et de l'hydroxytyrosol chez l'humain (Visioli, Galli et al. 2000, Vissers, Zock et al. 2002). Ils ont mis en avant une absorption intestinale traduite par la présence de tyrosol et d'hydroxytyrosol dans les

urines, principalement sous forme de conjugués glucuronidés (Visioli, Galli et al. 2000, Tuck, Freeman et al. 2001). D'après les études sur les humains, les composés phénoliques de l'huile d'olive seraient absorbés à plus de 55-66 % et au moins 5 % seraient excrétés dans les urines sous forme de tyrosol ou d'hydroxytyrosol (Vissers, Zock et al. 2004).

Dans un système de modèle cellulaire de la barrière intestinale (cellules Caco2 différenciées), Manna et al. montrent que l'hydroxytyrosol est rapidement transporté par diffusion passive au niveau de l'épithélium intestinal (Caterina Manna 2000), et plus précisément au niveau du jéjunum et de l'iléon chez l'animal et chez l'humain (Vissers, Zock et al. 2002, Corona, Tzounis et al. 2006). De plus, chez le rat, le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont quasi totalement absorbés après ingestion d'une dose de composés phénoliques dilués dans une phase huileuse, et seulement à 75 % pour le l'hydroxytyrosol et 71 % pour le tyrosol administrés dans une phase aqueuse (Tuck, Freeman et al. 2001), ce qui démontre l'importance du véhicule utilisé. L'oleuropéine semble plus stable que l'hydroxytyrosol durant la digestion (Soler, Romero et al. 2010, López de las Hazas, Piñol et al. 2016), notamment dans les conditions gastriques (digestion à la pepsine- HCl à pH 2), mais les sécoiridoïdes semblent moins résistants à la digestion duodénale (Soler, Romero et al. 2010). D'autres études suggèrent l'hydrolyse de l'oleuropéine en hydroxytyrosol dans l'estomac (Corona, Tzounis et al. 2006). L'oleuropéine étant retrouvée dans le plasma quelque temps après l'hydroxytyrosol (de Bock, Thorstensen et al. 2013), il est probable qu'une partie de l'oleuropéine soit hydrolysée et une autre partie absorbée dans l'estomac. Selon une récente étude, seulement 30 % de l'hydroxytyrosol, 20 % de l'oleuropéine et du tyrosol sont retrouvés après incubation dans des conditions similaires que celles retrouvées au niveau du tractus gastro-intestinal (Martin-Vertedor, Garrido et al. 2016).

L'acide *p*-coumarique est bien assimilé chez le rat, à travers tout l'intestin avec une prédominance dans le jéjunum (Zhao and Moghadasian 2009). De plus, contrairement à d'autres composés phénoliques, il est absorbé sous forme libre (non conjugué). Seulement 10 min après ingestion orale chez le rat, 57% d'acide *p*-coumarique retrouvé dans le plasma est sous forme libre (Konishi, Hitomi et al. 2004). Chez l'humain, l'acide *p*-coumarique est faiblement retrouvé après ingestion d'huile d'olive, probablement du fait de sa faible concentration. En effet, lorsqu'il est présent en concentration initiale plus importante, par exemple dans les jus de fruits rouges, un pic plasmatique peut-être observé une heure après ingestion (Rechner, Kuhnle et al. 2002).

Métabolisme digestif :

Les composés phénoliques de l'huile d'olive sont retrouvés dans le plasma et dans les urines. Cependant, ils subissent plusieurs modifications au cours de la digestion et durant le cycle entéro-hépatique (Marrugat, Covas et al. 2004). Visioli et al estimaient que 98 % des composés phénoliques étaient retrouvés dans le plasma et les urines sous formes conjuguées (Visioli and Galli 2001).

Lors de leur ingestion, les composés phénoliques sont considérés comme des xénobiotiques et suivent donc les mêmes voies de métabolisation. Ainsi, leur biodisponibilité est perturbée par les biotransformations relatives aux enzymes de détoxifications. Il existe les enzymes de phase I, principalement représentées par le cytochrome P450 des hépatocytes. À travers des réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyses, ils augmentent la solubilité des xénobiotiques en phase aqueuse pour permettre leur élimination dans les urines. Viennent ensuite les enzymes dites de phases II qui réalisent trois types de conjugaisons : les méthylations, sulfatations et glucuronidations. Ces trois modifications ont aussi pour objectif d'augmenter la solubilité et l'excrétion des métabolites conjugués (Figure 13).

Les méthylations sont assurées par la COMT (catéchol-O-méthyl transférase). Le groupe méthyle d'une S-adenosyl-L-méthionine est transféré sur les composés phénoliques possédant une fonction catéchol, comme l'oleuropéine ou l'hydroxytyrosol, principalement en position 4' (Figure 12). La méthylation de l'hydroxytyrosol est largement décrite dans la circulation plasmatique (Corona, Tzounis et al. 2006, Corona, Spencer et al. 2009) (de Bock, Thorstensen et al. 2013) et dans certains organes chez le rat (Serra, Rubio et al. 2012, López de las Hazas, Piñol et al. 2016, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018) et entraîne la production de l'alcool homovanillique. La méthylation de l'oleuropéine n'est pas rapportée. En effet, aucun métabolite ne semble être issu de la méthylation directe de l'oleuropéine malgré la présence de la fonction catéchol.

Les sulfatations ont lieu principalement dans le foie à l'aide des sulfotransférases (SULT). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate, principalement à partir du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), sur un groupe hydroxyle.

Les glucuronidations sont quant à elles assurées par les UDP-glucuronosyl transférases (UDPGT) à partir de l'acide UDP-glucuronique. Contrairement aux sulfotransférases, les UDPGT sont exprimés dans une large variété de tissus. D'après Corona et al, (Corona, Tzounis et al. 2006) ce sont les UDPGT des entérocytes qui sont responsables de la glucuronidation de l'hydroxytyrosol.

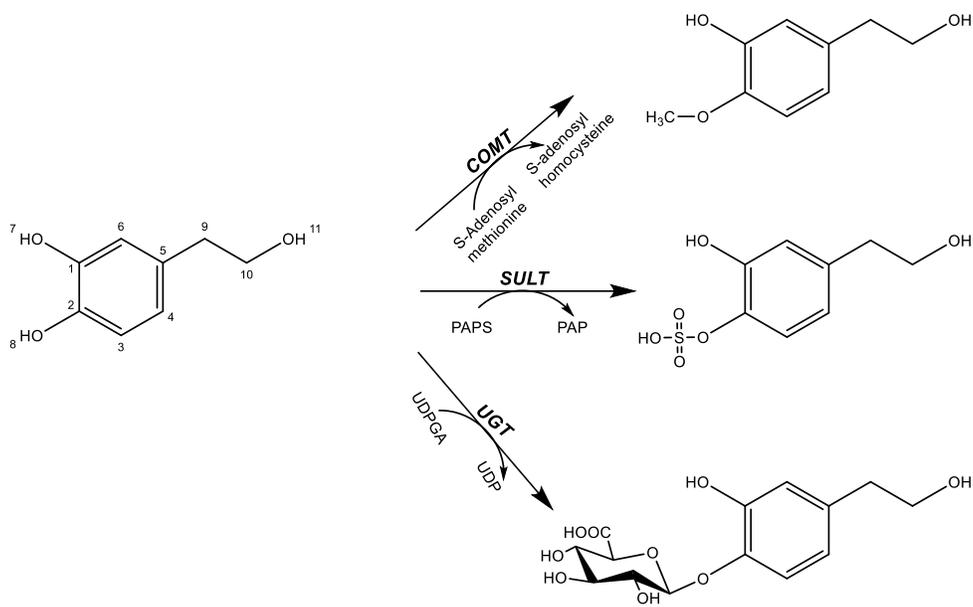


Figure 13 : Biotransformation de l'hydroxytyrosol par les enzymes de phases II.

Malgré ces modifications structurales, plusieurs études démontrent que ces composés phénoliques conservent leurs propriétés biologiques (Tuck, Freeman et al. 2001, Corona, Tzounis et al. 2006, Corona, Spencer et al. 2009, Serreli and Deiana 2018). Par exemple, chez l'humain, les niveaux plasmatiques de malondialdéhyde, issu de la peroxydation lipidique, ont été inversement corrélés aux concentrations d'hydroxytyrosol sulfate après ingestion d'un extrait de feuille d'oliviers (García-Villalba, Larrosa et al. 2014), ce qui suggère une action antioxydante.

D'autres modifications sont possibles durant le tractus gastro-intestinal. L'acidité de l'estomac peut entraîner une déglycosylation de l'oleuropéine, qui sera ensuite glucuronidée dans le foie et retrouvée sous forme de dérivés glucuronidés et aglycones dans la circulation et les tissus.

Une autre forme de métabolisation doit être prise en compte, mais son étude est difficile. Il s'agit de la métabolisation par le microbiote. En effet, il a été reporté que la composition bactérienne du microbiote influençait la métabolisation des composés phénoliques, et donc leur biodisponibilité (Corona, Tzounis et al. 2006, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018, Pasinetti, Singh et al. 2018). Il convient de noter que l'acide *p*-coumarique est aussi un métabolite issu de l'action du microbiote sur les composés phénoliques (Gasperotti, Passamonti et al. 2015).

Passage de la barrière hématoencéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE) est une protection pour le cerveau. Elle se situe au niveau des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau et ne laisse passer que de petites molécules de manière paracellulaire grâce à plusieurs types de jonctions, dont des jonctions serrées. Il peut aussi exister une diffusion passive pour les petites molécules lipophiles. Enfin, il existe des transporteurs ou des canaux pour laisser passer des complexes plus importants.

Plusieurs études ont démontré l'intérêt des composés phénoliques de l'huile d'olive dans les MND grâce à leur capacité à passer la BHE. En effet, une des caractéristiques pharmacologiques nécessaires pour endiguer des maladies cérébrales est le passage de la barrière protectrice séparant le cerveau du reste de l'organisme.

Les composés phénoliques retrouvés dans le cerveau :

D'Angelo et al. ont montré que suite à une injection intraveineuse d'hydroxytyrosol chez les rats, non seulement l'hydroxytyrosol était retrouvé dans le cerveau, mais aussi plusieurs composés issus du métabolisme de l'hydroxytyrosol comme l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, l'alcool ou encore l'acide homovanillique (D'Angelo, Manna et al. 2001). Plus récemment, ces métabolites ont été retrouvés dans les cerveaux de rats suite à leur gavage avec de « l'olive cake » (un produit dérivé de l'extraction d'huile d'olive), ainsi que d'autres métabolites sulfatés ou glucuronidés, comme l'hydroxytyrosol-glucuronide ou l'acide homovanillique sulfaté, mais aussi du tyrosol sulfate et des dérivés de l'oleuropéine et de l'acide *p*-coumarique (Serra, Rubio et al. 2012) (Gasperotti, Passamonti et al. 2015). Après une supplémentation de 21 jours avec de l'oleuropéine, des sécoiridoïdes et de l'hydroxytyrosol libre et sulfaté ont été retrouvés dans les cerveaux de rats. Ces différentes études attestent de la biodisponibilité de ces composés phénoliques d'un point de vue cérébral, bien qu'ils ne soient pas uniquement retrouvés sous leur forme libre. Cependant, ces composés ne sont pas toujours retrouvés sous leur forme initiale, mais sous forme méthylée et sulfatée.

Métabolisme de la dopamine et composés phénoliques

Il est important de noter que le tyrosol, tout comme l'hydroxytyrosol, sont aussi des composés synthétisés chez l'humain et chez les animaux. En effet, une faible partie du métabolisme de la dopamine et de la tyrosine, deux neurotransmetteurs, entraîne la production de ces deux composés (Rodriguez-Morato, Boronat et al. 2016). L'existence de ces deux composés de manière endogène est un bon argument pour leur utilisation au niveau cérébral, mais des

précautions sont nécessaires lors de leur dosage suite à l'administration de composés phénoliques de l'huile d'olive afin de ne pas confondre métabolisme endogène et apport exogène.

La biodisponibilité cérébrale des composés phénoliques de l'huile d'olive associée à leurs propriétés biologiques, en fait des candidats intéressants pour lutter contre les MND. Cependant, leurs mécanismes d'action dépendant de leur structure ne sont pas totalement élucidés. Il convient d'étudier les propriétés physico-chimiques particulières des composés phénoliques pour comprendre davantage leur mode d'action afin de pouvoir en tirer profit dans le cadre des MND.

IV.C. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques

Les diverses propriétés bio-physico-chimiques des composés phénoliques en font des composés intéressants. L'activité antioxydante des polyphénols est étroitement associée à leur structure chimique. Tout d'abord, il s'agit d'une molécule amphiphile. Le noyau aromatique du phénol est plutôt hydrophobe tandis que la fonction hydroxyle est plus polaire. De plus, les différents substituants présents sur le noyau phénol jouent un rôle prépondérant dans leur capacité antioxydante.

IV.C.a. Antioxydants directs

Les polyphénols sont des composés particulièrement disposés à agir comme des antioxydants à travers leur structure et leur réactivité. Les paragraphes suivants visent à décrire ces propriétés ainsi que leurs subtilités structurelles et mécanistiques.

Propriétés réductrices et oxydation

Pouvoir réducteur, structure et oxydation

La capacité réductrice d'un composé relève de la facilité avec laquelle il peut céder un ou plusieurs électron(s), autrement dit à sa capacité à s'oxyder. Plus un composé est réducteur, moins l'énergie nécessaire pour lui arracher un électron est importante et plus il sera en capacité de réduire une espèce. Une cinétique rapide sera déterminante pour l'efficacité d'inhibition des radicaux. Dans le cas d'un monophénol, le transfert d'un électron génère un radical cation qui est un acide fort et se déprotone immédiatement pour former un radical aryloxy (ou phénoxy) correspondant (Figure 14) (Dangles 2006). Le noyau aromatique permet une délocalisation électronique qui induit une stabilité relative du radical phénoxy plus importante que les radicaux EROs initialement présents (Cuvelier, Richard et al. 1992).

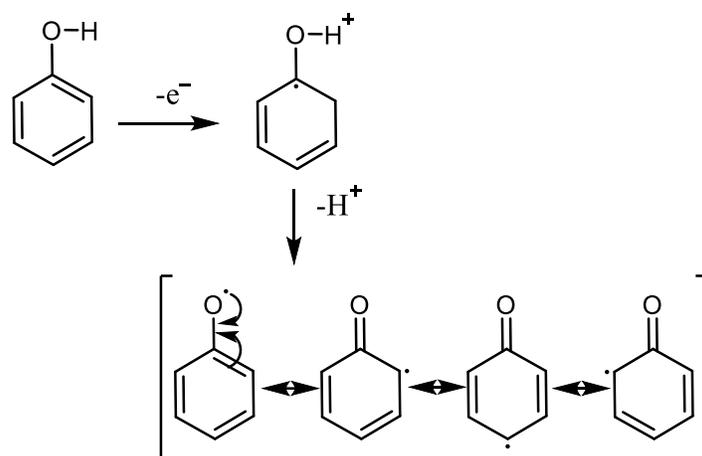


Figure 14 : Processus d'oxydation du phénol par transfert monoélectronique et formation du radical phénoxy stabilisé par ses formes mésomères.

La capacité réductrice plus ou moins élevée des composés phénoliques est directement liée à leur structure. Ainsi, il a été montré que *in vitro* les composés dihydroxylés présentent des capacités réductrices supérieures à leurs homologues monohydroxylés, la présence d'une substitution en position *ortho* favorisent la stabilisation du radical phénoxy (Cuvelier, Richard et al. 1992, Gülçin 2012, De La Cruz, Ruiz-Moreno et al. 2015). En effet, de nombreuses études soulignent les capacités réductrices plus importantes de l'hydroxytyrosol ou de l'acide caféique en comparaison de celle de leurs homologues monohydroxylés tyrosol et acide *p*-coumarique (Figure 15) (Chimi, Cillard et al. 1991, Nardini, D'Aquino et al. 1995, Roche, Dufour et al. 2005, Rietjens, Bast et al. 2007, Kadoma and Fujisawa 2008, Aree and Jongrungruangchok 2018).



R= H : acide *p*-coumarique

R=OH : acide caféique

R=OCH₃ : acide férulique

R= H : tyrosol

R=OH : hydroxytyrosol

R=OCH₃ : alcool homovanillique

Figure 15 : Structures de composés phénoliques monohydroxylés et de leurs homologues dihydroxylés ou méthylés.

En accord avec ces observations, les composés phénoliques de l'huile d'olive, types catéchols, s'oxydent à un potentiel plus faible que les structures de types monophénols (Paradiso, Di Mattia et al. 2016).

L'oxydation monoélectronique des catéchols conduit à la formation d'un radical aryloxy réactif, aussi appelé semiquinone (Figure 16). S'ensuit une perte d'électron qui forme une *ortho*-quinone. On parle alors d'oxydation biélectronique impliquant deux électrons et deux protons. L'oxydation des catéchols en *o*-quinone est un phénomène réversible.

Il est important de noter que les semiquinones peuvent être à l'origine de ROS. En effet, le radical semiquinone ArO^{\bullet} peut réagir avec l' O_2 et former le radical $O_2^{\bullet-}$ puis du H_2O_2 par dismutation (Figure 17). Ces réactions ont été décrites entre les catéchines et l' O_2 (Mochizuki, Yamazaki et al. 2002). Cette réaction est appelée « auto-oxydation » (Figure 18). De plus, la semiquinone peut aussi réagir avec l'anion superoxyde et former directement du H_2O_2 . Ces réactions sont notamment suspectées d'être à l'origine des effets paradoxaux des composés phénoliques dans les systèmes biologiques (Chichirau, Flueraru et al. 2005).

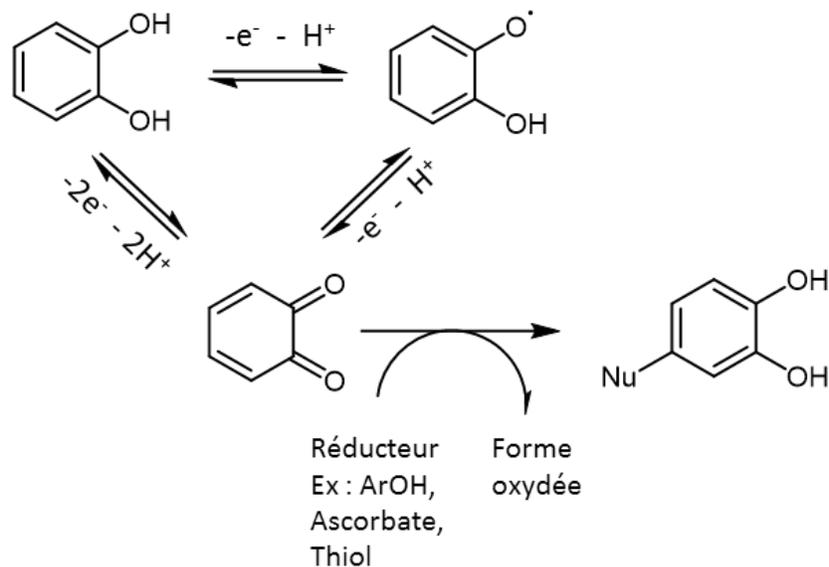


Figure 16 : Oxydation des catéchols et réduction des quinones, suivie d'une addition nucléophile

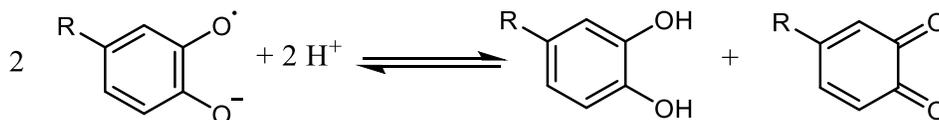


Figure 17 : Dismutation du radical semiquinone en quinone et catéchol.

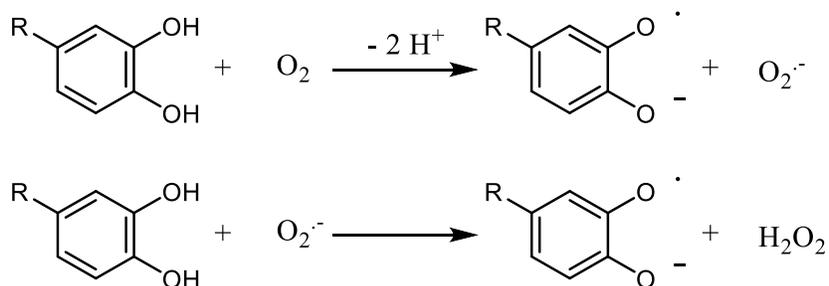
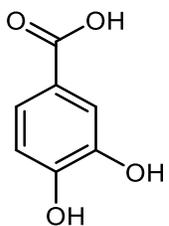


Figure 18 : Formation d'EROs suite à l'auto-oxydation de la fonction catéchol.

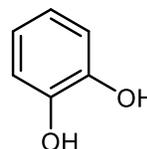
La capacité antioxydante dépend donc du nombre et de la position des groupes hydroxyles, mais aussi des types de substituants sur le noyau phénolique. Il existe des substituants donateurs d'électrons (comme les groupes $-OH$ et les groupes $-OCH_3$) et des substituants attracteurs d'électrons présents notamment dans les acides phénoliques ($-COOH$ et $-CH=CH-COOH$). Par exemple, la présence de $-CH=CH-COOH$ dans les acides cinnamiques explique leurs plus fortes activités antioxydantes en comparaison des acides benzoïques qui ne contiennent que la fonction carboxyle (Cuvelier, Richard et al. 1992). Cependant, la présence du $-COOH$ pourrait avoir un rôle limitant dans l'activité antioxydante puisqu'il a été remarqué que l'acide protocatéchique était moins efficace que le pyrocatechol (Figure 19) (Gülçin 2012, Umeno, Takashima et al. 2015). Concernant les groupes donateurs d'électrons, le groupe $-OH$ est un donneur d'électron plus fort que le groupe OCH_3 , comme le démontre *in vitro* la capacité de l'hydroxytyrosol à diminuer la peroxydation des lipides plus importante que pour l'alcool homovanillique (Figure 15) (Rietjens, Bast et al. 2007).

Par ailleurs, l'hydroxytyrosol se montre plus efficace que l'oleuropéine pour piéger l'anion superoxyde tandis que leur efficacité s'inverse concernant le radical hydroxyle (Chimi, Cillard et al. 1991). L'oleuropéine est une molécule plus complexe. Concernant sa moitié hydroxytyrosol, il apparaît que la présence de glucose n'a que peu d'action sur ses capacités réductrices, par comparaison avec l'oleuropéine aglycone. Cependant, le site C3 de l'oleuropéine (Figure 20) montre la plus faible énergie de dissociation de liaison (BDE), qui peut se traduire par la facilité à donner un hydrogène, ce qui en théorie en fait le site le plus réducteur de la molécule (Hassanzadeh, Akhtari et al. 2014). Cependant, uniquement de petits radicaux pourraient être pris en charge par ce site, à cause de l'encombrement stérique qui limite l'accès aux radicaux plus importants comme le radical DPPH $^{\cdot}$.

Ces informations soulignent l'importance de la structure entière du composé au-delà de la seule structure phénolique et du radical vis-à-vis duquel sa capacité antioxydante est étudiée.



Acide protocatéchique (ou acide 3,4-dihydroxybenzoïque).



Pyrocatechol (ou catéchol, ou benzène-1,2-diol).

Figure 19 : Structure de l'acide protocatéchique et du catéchol

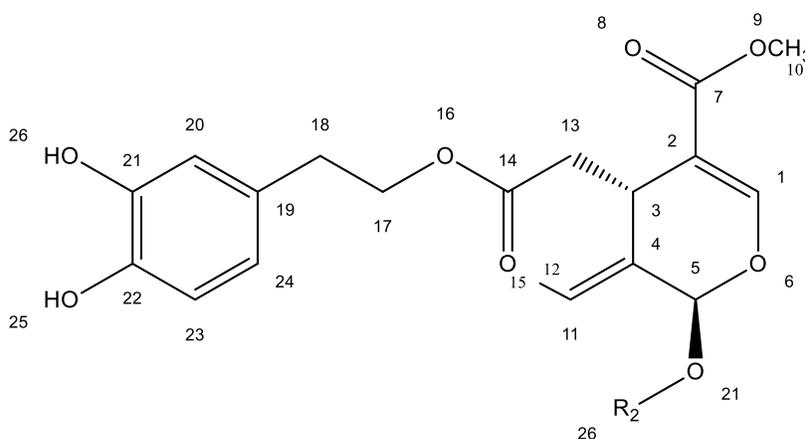


Figure 20 : Structure de l'oleuropéine avec numérotation des atomes selon (Hassanzadeh, Akhtari et al. 2014).

Acidité

La fonction phénol présente un caractère acide relativement faible. Les pka des composés phénoliques sont généralement compris entre 8 et 10. Par exemple, le tyrosol présente un pka de 10, l'oleuropéine de 9,7, l'hydroxytyrosol de 9,5 et l'acide *p*-coumarique de 8,4 (Erdemgil, Sanli et al. 2007, Kaleh and Geißen 2016). Les formes déprotonées, qui apparaissent par coupure hétérolytique de la liaison OH, forment des phénolates et voient leurs charges négatives délocalisées sur le noyau aromatique. Cette forme amplifie le caractère réducteur et la

nucléophilie des composés phénoliques, mais uniquement des transferts d'électrons (ET) pourront survenir (Dangles 2012).

Nucléophilie et composés électrophiles

Les composés phénoliques sont des composés nucléophiles en raison d'une forte densité électronique au niveau de l'oxygène de la fonction OH dans les positions *ortho* et *para* du fait de la délocalisation électronique. Ce caractère nucléophile permet des réactions de substitution électrophiles en position *ortho* ou *para* (alkylation, acylation).

À l'inverse, les quinones possèdent un déficit électronique qui entraîne un caractère électrophile délocalisé sur plusieurs positions du cycle aromatique dépendamment des formes mésomères (Figure 21).

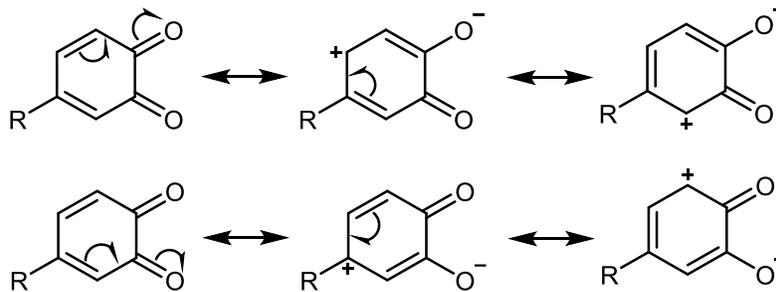


Figure 21 : Formes mésomères des quinones.

L'instabilité des radicaux semiquinones et quinones couplées à leur caractère électrophile les encouragent à réagir avec des composés nucléophiles comme des composés phénoliques. Ces processus génèrent des dimérisations voire des oligomérisations, mais aussi des dismutations, des réactions avec l'oxygène et avec des réducteurs ou des fonctions thiols s'ils sont présents dans le milieu de formation de ces radicaux. Par exemple, dépendamment des conditions de fabrications de stockage de l'huile d'olive, l'oleuropéine peut s'oxyder en semiquinone et quinone, suivies de sa polymérisation rapide à travers des couplages radicalaires qui donnent naissance à des pigments bruns (Cardoso Susana, Guyot et al. 2004, Cardoso, Guyot et al. 2006, Ramírez, Gandul-Rojas et al. 2015).

Tout comme pour leur caractère réducteur, la structure des quinones et semiquinones influence leur stabilité et donc leur activité *in vitro* et *in vivo* (Leatham, King et al. 1980). Par exemple, la présence de la double liaison C=C participe à la stabilisation du radical par résonance (Cuvelier,

Richard et al. 1992). Pour l'oleuropéine, la présence du sucre, de la moitié catéchol et de la liaison hydrogène intramoléculaire entre ces deux parties permet une stabilité accrue du radical, par comparaison avec le radical créé par l'oxydation de l'oleuropéine aglycone (Hassanzadeh, Akhtari et al. 2014).

Le milieu d'étude des composés phénoliques influe aussi sur leur stabilité. Il a été montré que l'hydroxytyrosol était beaucoup moins stable dans des solutions ioniques élevées (52 mg/L de calcium, 21 mg/L de magnésium) par comparaison avec des concentrations ioniques plus faibles (4 et 2 mg/L) (Zafra-Gómez, Luzón-Toro et al. 2011). L'oleuropéine est plus stable dans le méthanol que dans l'eau (Malik and Bradford 2008).

Formation de nouveaux composés

Les radicaux phénoxyles issus de l'oxydation monoélectronique des monophénols, malgré la résonance, ne sont pas stables et tendent à évoluer, ce qui rend leur oxydation irréversible. En milieu aqueux, l'oxydation des monophénols par la tyrosinase ou par électrochimie entraîne la formation de quinones et de semiquinones (Kalyanaraman, Hintz et al. 1986, Enache and Oliveira-Brett 2011). Les produits d'oxydation majeurs sont des dimérisations radicalaires à travers la formation de liaison C-C (biaryl) et C-O (biaryléther) (Dangles 2012).

Pour les composés catéchols, les semiquinones vont favoriser la dismutation qui entraîne la formation d'une quinone et d'un catéchol (Figure 17). Des réactions avec d'autres espèces réactives peuvent aussi avoir lieu et former la quinone correspondante. De fait, les semiquinones peuvent agir comme des nucléophiles avec les quinones en position 4 et 5 (Santos, Bergamini et al. 2005). Les quinones réactives vont alors subir des réactions d'additions comme des additions d'eau, des réactions avec d'autres composés phénoliques, ou encore des protéines, notamment avec les groupements carboxyles et thiols de peptides et de protéines. Ces réactions d'additions vont donner naissance à des produits d'addition de type Michael (Figure 22) (Guyot, Vercauteren et al. 1996).

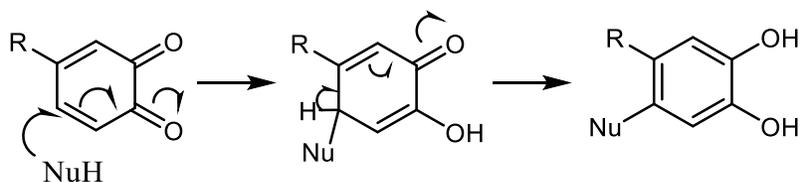


Figure 22 : Addition nucléophile de type Michael

Par ailleurs, des réactions de couplage radicalaire peuvent aussi avoir lieu et donner naissance à des dimérisations et à des oligomérisations des composés catéchols. Ce phénomène a été observé à plusieurs reprises lors de l'oxydation des catéchines, mais aussi lors de l'auto-oxydation de l'oleuropéine à des pH supérieurs à 11,1, ou lors de son oxydation par des polyphénols oxydases en présence d'oxygène atmosphérique (Figure 23) (Cardoso, Guyot et al. 2006, Gentile, Uccella et al. 2017).

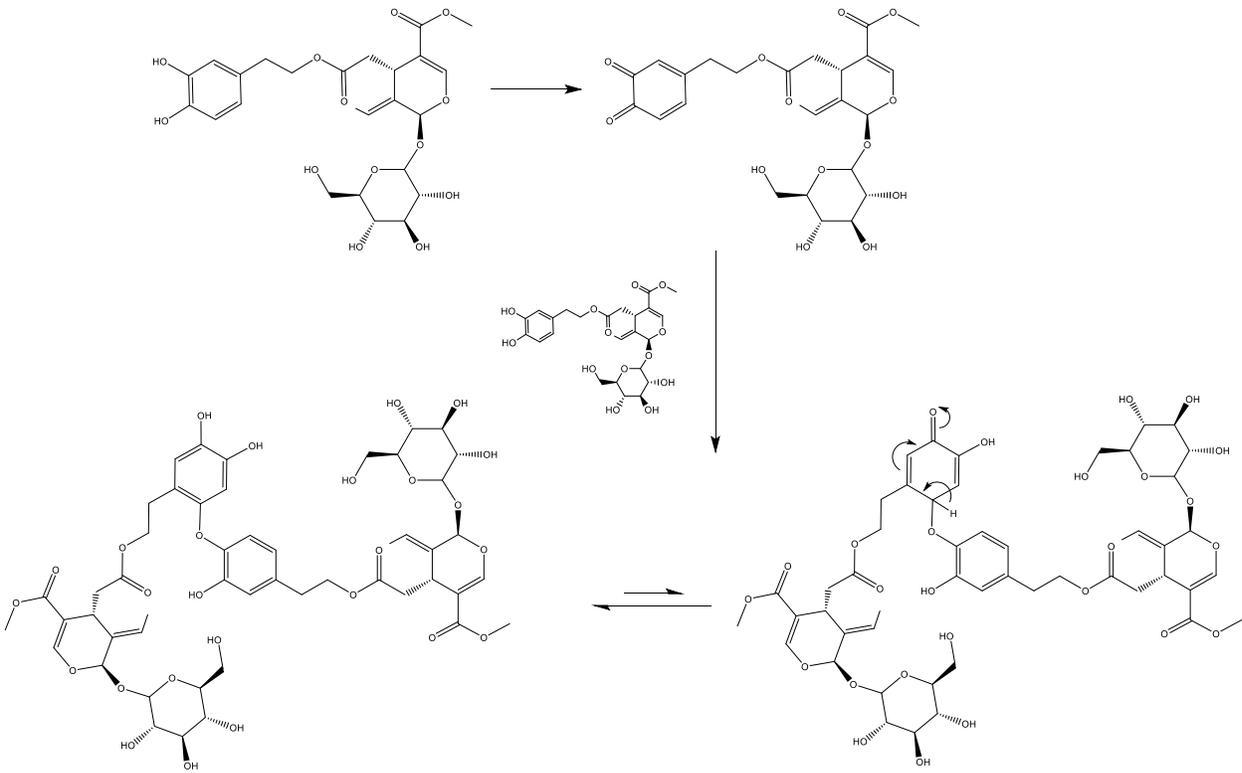


Figure 23 : Dimérisation de l'oleuropéine par couplage radicalaire.
Adapté de (Gentile, Uccella et al. 2017)

L'oxydoréduction couplée fait intervenir une quinone (ArO_b) et un *o*-diphénol ($ArOH_a$). Le transfert de deux électrons entre l'*o*-diphénol et la quinone mène à l'oxydation de l'*o*-diphénol (ArO_a) et à la réduction de la quinone ($ArOH_b$). La quinone (ArO_b) appartenant à un couple ayant un potentiel plus fort peut régénérer le catéchol ($ArOH_b$) et former la quinone (ArO_a) (Figure 24).

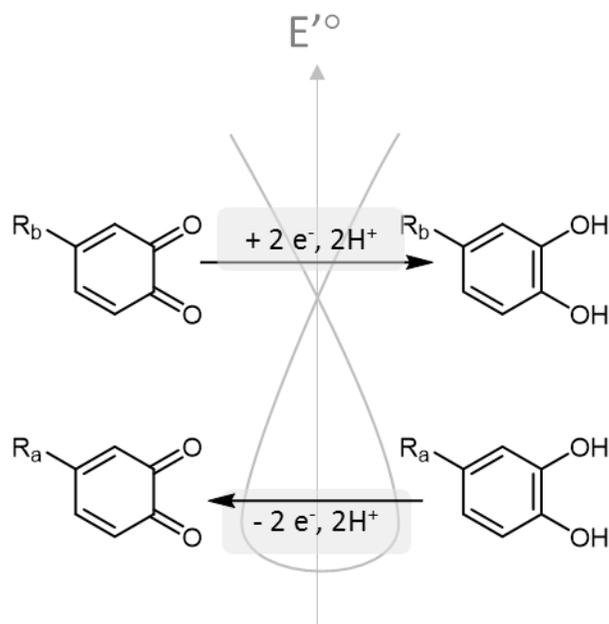


Figure 24 : Oxydoréduction couplée.

Il est important de considérer attentivement les conditions d'oxydation des composés phénoliques pour évaluer les mécanismes mis en jeu et les produits résultants. Par exemple, l'oxydation de l'hydroxytyrosol par une tyrosinase, après apparition de sa forme quinone, peut emprunter une voie de réactions radicalaires séquentielles des fonctions $-OH$ avec une autre quinone d'hydroxytyrosol et aller jusqu'à la cyclisation de sa chaîne latérale (Vogna, Pezzella et al. 2003). Cependant, lors de son oxydation par le système peroxydase / H_2O_2 , la présence du H_2O_2 génère la formation d'une *p*-quinone d'hydroxytyrosol suivi d'un couplage C-C avec une autre *o*-quinone de l'hydroxytyrosol (De Lucia, Panzella et al. 2006) (Napolitano, De Lucia et al. 2010). Par ailleurs, lors de son oxydation par le AAPH, (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride), la dimérisation intervient par le piégeage du radical, mais peut aussi se faire à travers la formation d'une *p*-quinone methide permettant l'addition d'une molécule d'eau dans la formation du dimère (Roche, Dufour et al. 2005).

Ces quelques exemples démontrent les multiples réactions pouvant être mises en jeu dépendamment du système dans lequel est étudié le composé d'intérêt, ainsi que les différents produits pouvant être obtenus après l'oxydation du composé phénolique. Ces données révèlent aussi la complexité de l'étude lorsque plusieurs composés sont analysés simultanément, d'où l'intérêt d'utiliser des solutions simplifiées pouvant mimer un ou deux paramètres des conditions biologiques.

L'analyse de ces métabolites issus de l'oxydation par des outils de plus en plus précis comme la spectrométrie de masse MS² permet d'améliorer les connaissances des différents produits pouvant être générés dépendamment des méthodes d'oxydation (Antolovich, Bedgood et al. 2004) (Di Maio, Esposito et al. 2011, Longo, Morozova et al. 2017). Le Tableau 20 en annexe I résume les composés observés suite à l'oxydation d'huile d'olive ou dans les déchets générés durant sa fabrication. En effet, les résidus du procédé de l'huile d'olive sont connus pour contenir un grand nombre de composés phénoliques, qui peuvent même devenir une source de contamination environnementale (Lozano-Sánchez, Giambanelli et al. 2011).

L'étude de l'oxydation des composés phénoliques *in vitro* permet d'extrapoler les éventuels mécanismes mis en jeu dans des systèmes biologiques pour affiner la compréhension des propriétés des composés phénoliques. En effet, il a été suggéré que les produits issus de l'oxydation des composés phénoliques peuvent avoir une action au niveau biologique et entrer en jeu dans les propriétés des composés phénoliques (Fási, Di Meo et al. 2019). Cependant, les méthodes d'oxydation sont nombreuses et les mécanismes impliqués différents, ce qui engendre une multitude de produits issus de l'oxydation. Or, si l'oxydation des composés phénoliques pouvait être mimée de manière proche de ce qui se produit dans un système biologique en conditions oxydatives, alors l'extrapolation des produits issus de l'oxydation des composés pourrait être évaluée.

Formation de complexe avec les protéines

Les propriétés électrophiles des quinones leur permettent de créer des produits issus de réactions d'addition de type Michael. Ce sont ces types de réactions qui sont impliquées dans la formation de complexe entre les protéines et les composés phénoliques. Les complexes composés phénoliques-protéines peuvent modifier la stabilité, les fonctions et l'élimination des protéines.

Les acides aminés réagissent préférentiellement avec leur groupement amine, sauf en cas de de groupement thiol, auquel cas c'est celui-ci qui va réagir en premier avec les radicaux phénoxyles et les quinones (Leatham, King et al. 1980, Wang, Thomas et al. 2006).

Il est important de noter qu'en l'absence de système oxydant les composés phénoliques ne semblent pas réagir avec les protéines (Leatham, King et al. 1980). D'un point de vue biologique, cette observation a son importance en ce sens qu'ils sont inoffensifs pour les protéines cellulaires en l'absence de génération de ROS.

Chélateurs de métaux

Les métaux sont des agents importants de génération de ROS. Or, les composés phénoliques peuvent agir en tant qu'antioxydants indirects par chélation des métaux de transition (Figure 25). L'étude des capacités de chélation des polyphénols a mis en évidence l'importance de la moitié catéchol pour chélater le Fe^{3+} (Van Acker, Van Den Berg et al. 1996, Perron, Wang et al. 2010). Mazziotti et al. ont confirmé l'importance de cette moitié dans l'oleuropéine en condition proche des conditions physiologiques, pH 7,2 (Mazziotti, Mazzotti et al. 2006). D'autres études ont montré les propriétés chélatrices de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol *in vitro* sur des modèles de cellules neuronales et *in vivo* sur des modèles murins (Schaffer, Podstawa et al. 2007, Capo, Pedersen et al. 2017).

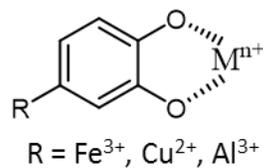


Figure 25 : Chélation des métaux de transition par la moitié catéchol.

Antioxydants indirects

Du fait de leur abondance dans l'alimentation, les composés phénoliques sont des antioxydants largement consommés. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* relatent leurs intérêts pour lutter contre l'apparition et pour diminuer le stress oxydatif.

Les propriétés biochimiques des composés phénoliques leur permettent d'agir à travers différentes voies : soit ils peuvent avoir un rôle direct de « scavenger » des radicaux libres, ainsi qu'une capacité de chélation des métaux de transition, soit ils peuvent agir de manière indirecte en modulant les facteurs cellulaires de la réponse au stress oxydatif tels que Nrf2 ou Nf-kB (Satoh, Stalder et al. 2015, Pierce, Piyankarage et al. 2016). En effet, les capacités rédox des formes oxydées (quinones, semiquinones, radical phénoxy) leur permettent d'interagir avec des protéines contenant des groupements thiols comme Keap1 et entraîne l'activation par phosphorylation du facteur Nrf2 et l'expression des enzymes antioxydantes sous son contrôle (Dinkova-Kostova, Kostov et al. 2017). Cette propriété a été démontrée pour plusieurs composés phénoliques de l'huile d'olive, dont l'oleuropéine ou l'hydroxytyrosol (Bayram, Ozcelik et al. 2012, Peng, Zhang et al. 2015, Sun, Wang et al. 2017). Plusieurs polyphénols possèdent la capacité d'inhiber l'activation de facteur Nf-kB (Seo, Fischer et al. 2018), dont le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine (St-Laurent-Thibault, Arseneault et al. 2011, Liu, Ahn et al. 2018).

Les différents mécanismes d'action peuvent être distincts les uns des autres ou bien être présents conjointement. C'est pourquoi il est important d'observer les mécanismes d'action des polyphénols selon différents axes d'études.

Un effet antioxydant secondaire est aussi dû à leur capacité à interagir avec le peptide amyloïde ou avec l' α -synucléine. Plusieurs études ont montré la capacité de l'oleuropéine ou de l'hydroxytyrosol à diminuer l'agrégation de ces protéines ainsi que de la protéine Tau phosphorylée, à diminuer le stress oxydatif induit par la formation des oligomères toxiques et la toxicité subséquente sur des modèles cellulaires (Daccache, Lion et al. 2011, Grossi, Rigacci et al. 2013, Palazzi, Bruzzone et al. 2018, Mohammad-Beigi, Aliakbari et al. 2019).

IV.C.b. Étude des propriétés antioxydantes des composés phénoliques

Aspects mécanistiques

Le processus antioxydant est un processus complexe qui fait intervenir des transferts d'électrons et de protons. Ces transferts sont dépendants des conditions d'analyses, tels que les solvants, les composés à l'étude et les radicaux utilisés. La plupart des tests mis au point pour étudier la capacité antioxydante des composés phénoliques sont très éloignés des conditions physiologiques. Cependant, les mécanismes de réactivité mis en jeu par les polyphénols sont difficilement observables au niveau de la cellule. C'est pourquoi il existe des méthodes *in vitro* basées sur les mécanismes de transferts (Tableau 9). Certaines méthodes font intervenir des mécanismes de transfert d'électrons (méthodes SET) tandis que d'autres font intervenir des mécanismes radicalaires de transfert d'atome d'hydrogène (méthodes HAT : Hydrogen abstraction transfert). Les deux types de réactivité peuvent mener à des produits réactionnels identiques, mais font intervenir des intermédiaires réactionnels différents (Figure 26). Le processus HAT implique un processus d'inhibition des radicaux par transfert d'atome d'hydrogène et fait intervenir la capacité de dissociation de la liaison O-H des fonctions hydroxyles (Eq 17). Il convient de noter qu'un processus HAT se réfère à un transfert de proton et d'électron simultané dans la même orbitale atomique. Il existe un mécanisme « sous-HAT », le mécanisme PCET, (Proton Concerted Electron Transfer) dans lequel le transfert de proton et d'électron simultané se fait dans deux orbitales atomiques différentes (Meyer, Huynh et al. 2007, Apak, Ozyurek et al. 2016).

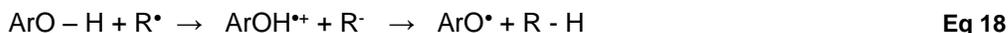
Le mécanisme SET entraîne une réduction du substrat oxydé en deux étapes : une première étape de transfert d'électron forme le radical cation $\text{ArOH}^{*\cdot}$ (Eq 18). Cependant, ce mécanisme réactionnel est peu probable entre les composés phénoliques et les EROs du fait de la forte instabilité du radical cation $\text{ArOH}^{*\cdot}$ (Di Meo, Lemaur et al. 2013).

Un troisième processus met en jeu le transfert simultané d'un électron et d'un proton SPLET (Sequential Proton-Loss Electron Transfer) (Eq 19). Ce mécanisme a notamment été observé lors de l'étude du piégeage du radical DPPH \cdot . Le bilan sera le même que lors du transfert d'atome d'hydrogène HAT, mais le processus séquentiel faisant intervenir l'anion phénolate favorise des constantes de vitesses plus importantes, car le phénolate ArO^- est un meilleur donneur d'électron que le phénol ArOH (Munoz-Rugeles and Alvarez-Idaboy 2015). (Di Meo, Lemaur et al. 2013, Dangles, Dufour et al. 2017).

HAT (*H-atom transfer*) (transfert d'atome d'hydrogène)



SET – PT (*Sequential electron transfer-proton transfer*) (transfert de proton et transfert d'électron séquentiel)



SPLET (*sequential proton loss–electron transfer*) Perte de proton et transfert d'électron séquentiel).



De fait, pour certains tests de capacité antioxydante, il est reconnu que les mécanismes HAT et SET peuvent avoir lieu en compétition (exemple de la méthode DPPH ou TEAC) (Tableau 9). Ce troisième type de piégeage vient compléter les mécanismes potentiellement mis en jeu dans l'activité antioxydante.

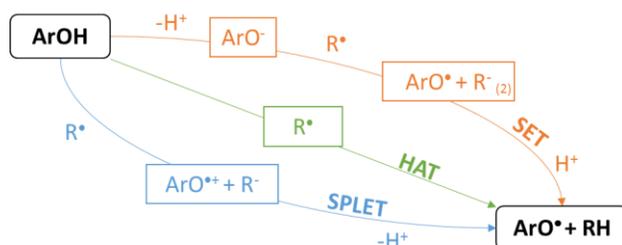


Figure 26 : Inhibition du radical par les composés phénoliques selon différents mécanismes (SET, HAT ou SPLET).

D'après (Lund and Baizer 1991, Nematollahia, Rafieeb et al. 2009, Lin, Li et al. 2015).

Tableau 9 : Classification des différents tests antioxydants en fonction du mécanisme mis en jeu.

Adapté de (Apak, Gorinstein et al. 2013), (Prior, Wu et al. 2005) (Cicco, Lanorte et al. 2009)

Tests	Radical ou oxydant	Mesure	Mécanisme prépondérant
DMPD <i>N,N</i> -diméthyl-1,4-diaminobenzène	DMPD •+	Absorbance (505 nm)	ET
FCR Folin -Ciocalteu reagent	Réactif FC	Absorbance (700–760 nm)	ET
TEAC Trolox equivalence antioxidant capacity	ABTS •+	Absorbance (734 nm)	HAT & ET
DPPH 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH •	Absorbance (515 nm)	HAT, ET, SPLET
FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power	Fe ³⁺ chélaté	Absorbance (595 nm)	ET
LDL oxydation	Cu ²⁺	Absorbance (234 nm)	ET
ORAC Oxygen Absorbance Radical Capacity	AAPH •	Fluorescence	HAT
PCL photochemiluminescence	O ₂ •-	Chemilumi-nescence	HAT
TRAP Totale reactive antioxidant potential	AAPH •	Fluorescence	HAT

Il convient de garder à l'esprit que le mécanisme prépondérant pour un système donné dépend de la structure, des propriétés de l'antioxydant, de sa solubilité dans le solvant utilisé et des paramètres d'étude (pH, température, concentration et ratio antioxydant / oxydant). Plusieurs études montrent une différence de capacité antioxydante des composés étudiés en fonction du radical utilisé (Tabart, Kevers et al. 2009, Tan and Lim 2015). C'est pourquoi la capacité antioxydante mesurée doit toujours se référer au contexte de l'étude, la capacité antioxydante totale pouvant différer des propriétés antioxydantes dans les systèmes biologiques. Cependant, la diversité des tests antioxydants et des radicaux utilisés, associés à un manque de

standardisation de ces tests rend difficile la comparaison des résultats obtenus entre les différentes études et les différents composés.

L'étude de l'oxydation des composés phénoliques, à travers l'étude de leur potentiel redox, permet de s'affranchir de certaines variations. De plus, les potentiels redox corrélerent avec la capacité antioxydante des composés phénoliques et sont plus précis que le test du DPPH (Gomes, Fernandes et al. 2008, Arteaga, Ruiz-Montoya et al. 2012).

Potentiel Rédox

En solution, la capacité réductrice d'un composé s'évalue par la valeur de son potentiel redox E_{redox} . Plus son potentiel est bas, moins l'énergie nécessaire pour lui arracher un électron est importante, donc plus le composé est réducteur. De fait, le potentiel redox du couple quinone/diphénol, et dans une moindre mesure celui du couple radical phénoxyde/phénol, étant relativement faible, des réactions de transferts d'atome d'hydrogène et/ou d'électron rapides avec les EROs peuvent avoir lieu et constituent l'un des principaux mécanismes antioxydants des composés phénoliques.

Les techniques de mesure de ces potentiels se basent sur la mesure des transferts d'électron comme la radiolyse pulsée ou par les techniques électrochimiques comme la voltammétrie cyclique (cyclic voltammetry CV) ou la voltammétrie différentielle à ondes carrées (Square Wave Voltammetry, SWV). Dans tous les cas, la mesure du potentiel dépend du milieu dans lequel sont étudiés les composés, du pH et de la température.

L'électrochimie : un outil pertinent

Les techniques électrochimiques sont un atout puissant pour l'étude des transferts d'électrons. Elles permettent d'étudier les réactions faisant intervenir un échange d'électrons à l'interface électrode/électrolytes :



où Ox et Red représentent les formes oxydée et réduite, n le nombre d'électrons e^{-} échangés. Elles peuvent aider à la compréhension de la réactivité des molécules à activité redox *in vivo* en étudiant les processus chimiques déclenchés par un transfert d'électron, en accédant à certains paramètres thermodynamiques (potentiel redox) et cinétiques. Elles permettent également de générer directement à l'électrode des radicaux physiologiques (e.g. $\text{O}_2^{\bullet -}$), contrairement aux tests précédemment cités type DPPH permettant l'analyse des propriétés radicophiles du substrat. Les

polyphénols étant des espèces électroactives, l'étude de leur mécanisme d'oxydation par l'utilisation d'outils électrochimiques est rapide, sensible, facile à mettre en œuvre, reproductible, et n'utilise pas de radicaux, l'électrode servant d'oxydant (Cheng, Ren et al. 2002).

Principes :

Une réaction électrochimique correspond à un transfert d'électron hétérogène entre une électrode et une espèce en solution (Figure 27). Ces réactions de transfert d'électrons peuvent être étudiées par les techniques de voltammétrie à trois électrodes (électrode de travail ou indicatrice de petite surface, électrode de référence, électrode auxiliaire) connectées à un potentiostat-galvanostat qui permet le contrôle du potentiel (dans le circuit travail-référence) et la mesure du courant (dans le circuit travail-auxiliaire) (Bedioui 1999). Le montage est schématisé (Figure 27). Des voltammogrammes $I = f(E)$ sont générés par un balayage de potentiel en modifiant progressivement la tension de consigne contrôlée par le potentiostat et la mesure du courant d'électrolyse correspondant. Dans ce système, l'électrolyse se produit dans la couche de diffusion de faible volume ($A \cdot \delta(t)$). La concentration de l'espèce étudiée n'est donc pas modifiée en solution.

L'intensité de la réaction électrochimique est influencée par le transfert des électrons entre espèce électroactive et électrode, par le transfert de masse (diffusion des espèces vers l'électrode ou vers la solution), par les réactions chimiques pouvant avoir lieu avant ou après la réaction électrochimique et enfin par l'adsorption éventuelle de l'espèce électroactive, ou du produit issu de la réaction, à la surface de l'électrode. Ce dernier type de réaction diminue la surface active de l'électrode ce qui se traduit par une réduction du transfert de charge et du courant mesuré, et peut aussi modifier la surface de l'électrode, modifiant ainsi la réaction (Enache and Oliveira-Brett 2011). Le nettoyage de la surface de l'électrode est une étape cruciale pour enrayer les erreurs de mesures et augmenter la répétabilité.

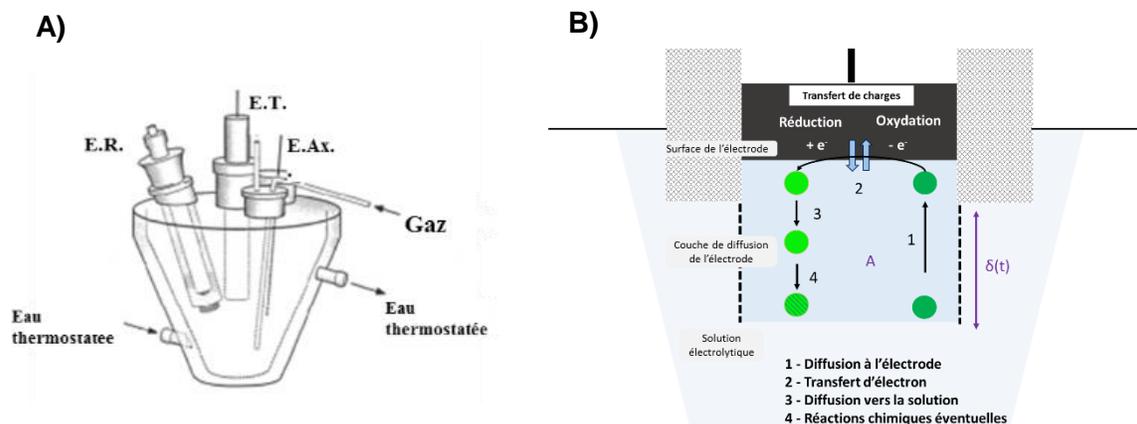


Figure 27: Schématisation du montage et de la réaction électrochimique à l'électrode.

A) Représentation schématique de la cellule électrochimique thermostatée à trois électrodes : E.T. : électrode de travail, E.R. : électrode de référence, E.Ax. : électrode auxiliaire.

B) Représentation schématique de la réaction électrochimique à la surface de l'électrode.

La Voltammétrie cyclique

Une utilisation courante de l'électrochimie est l'application d'une rampe de potentiels (balayage linéaire) « aller » suivi d'un balayage linéaire « retour », le second étant l'inverse du premier afin de revenir au potentiel de départ pour terminer le cycle, d'où son nom, la voltammétrie cyclique. Le potentiel imposé de départ E_i évolue de telle manière que $E = E_i \pm vt$, où v est la vitesse de balayage, le signe + correspondant à un balayage vers les potentiels positifs et le signe - à un balayage vers les potentiels négatifs, ce qui permet de tracer la courbe $I = f(E)$ (Figure 28).

Le transfert d'électron est rapide si la modification structurale est peu importante et nécessite une faible énergie d'activation (modification de la sphère de solvatation ou de l'atmosphère ionique); dans ce cas, le système rédox est dit Nernstien, rapide, ou réversible (l'équation de Nerst est détaillée en Annexe II). La valeur de la constante de vitesse du transfert d'électron k° est supérieure à $2 \cdot 10^{-2}$ cm/s. Plus la modification structurale est importante, plus l'énergie d'activation est importante et plus le transfert d'électron est lent. Il sera alors nécessaire d'appliquer un surpotentiel d'électrode important η pour provoquer le transfert d'électron. La valeur de la constante de vitesse du transfert d'électron k° est inférieure à 10^{-5} cm/s, le système est dit lent. Pour des constantes de vitesse comprises entre $10^{-5} < k^\circ < 2 \cdot 10^{-2}$, les systèmes sont dits quasi-réversibles.

Si l'on souhaite étudier un phénomène d'oxydation de l'espèce en solution, le balayage de potentiel est effectué dans le sens anodique (potentiel croissant). À l'inverse, si l'on souhaite observer un phénomène de réduction le balayage est effectué dans le sens cathodique (potentiel décroissant). Avant l'atteinte du potentiel d'oxydation, seul un courant résiduel est observable. L'observation d'une augmentation exponentielle de l'intensité du courant correspond au transfert d'électron. Ce signal indique le potentiel à partir duquel s'oxyde le composé en solution dans le cas d'un balayage dans le sens anodique, E_{pa} est mesuré au maximum du pic.

Dans le cas d'un système réversible, on observe un potentiel cathodique (E_{pc}) sur le balayage retour, correspondant à la réduction de l'espèce formée suite à l'oxydation. Cette observation indique que l'espèce formée est stable à l'échelle de temps de la voltammétrie et que cette espèce est réductible (Figure 29. A).

Le critère de réversibilité électrochimique s'évalue sur un voltammogramme à travers différents paramètres :

- $\Delta E_p = 59/n \text{ mV}$ à 25 °C, indépendant de v ($\Delta E = |E_{pa} - E_{pc}|$)
- $I_p/v^{1/2}$ indépendant de v
- $(I_{pa}/I_{pc}) = 1$

Si ces paramètres sont vérifiés, le système est dit réversible ce qui signifie que la vitesse du transfert d'électron est contrôlée par la diffusion, que la réversibilité chimique est observée (il n'y a pas de réaction chimique qui suivant le transfert électronique et le produit formé à l'électrode est stable). Les expressions mathématiques du courant en fonction du potentiel sont détaillées en annexe II.

À l'inverse, l'absence de signal lors du balayage retour indique que le composé formé suite à l'oxydation n'est pas stable à l'échelle de temps de la voltammétrie, et démontre un système irréversible (Figure 29.B).

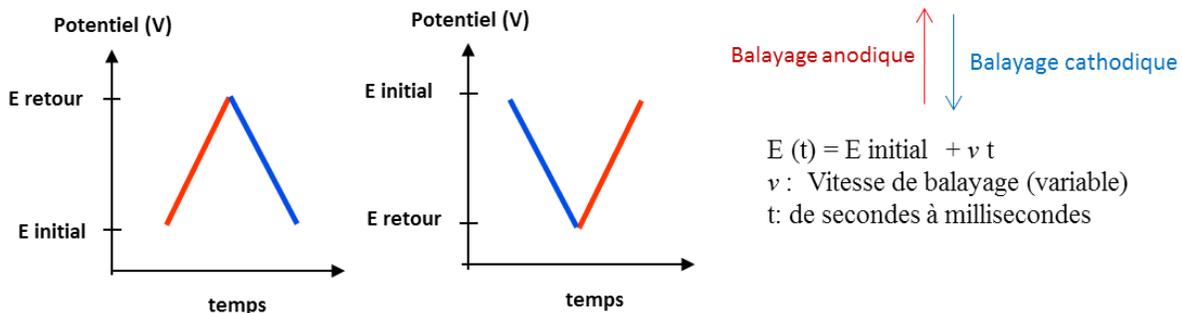


Figure 28 : Représentation schématique de la rampe de potentiels appliqués aux bornes de l'électrode lors de la voltammétrie cyclique.

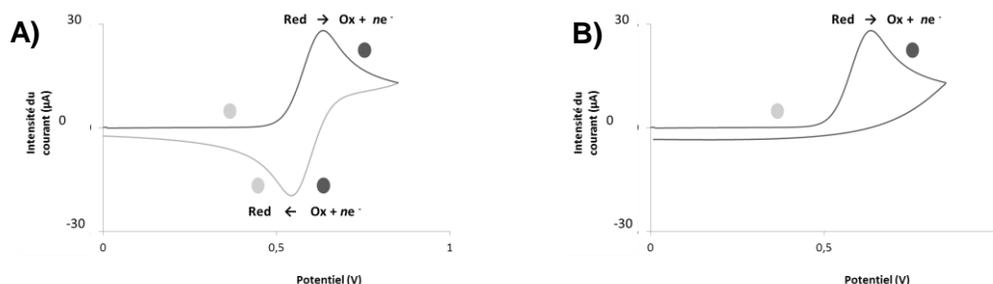


Figure 29 : Voltammogramme d'un système réversible (A) et d'un système irréversible (B).

La voltammétrie cyclique a été utilisée à de nombreuses reprises pour caractériser la capacité réductrice des composés phénoliques ou de matrice biologique par la valeur de leur potentiel d'oxydation E_{pa} (Hotta, Nagano et al. 2002, Janeiro and Oliveira Brett 2004, Janeiro, Novak et al. 2007, Enache, Amine et al. 2013). De plus, l'observation ou non d'un pic cathodique sur le balayage retour permet de déterminer la réversibilité de l'oxydation du composé et fournit donc des indices sur les mécanismes d'oxydation des molécules étudiées (Hotta, Nagano et al. 2002).

Voltammétrie différentielle à ondes carrées (Square Wave Voltammetry, SWV)

Ce type de voltammétrie se distingue de la voltammétrie cyclique par la façon dont le potentiel est imposé à l'électrode. Là où la CV incrémente le potentiel après chaque mesure du courant, dans la SWV, une impulsion de potentiel va être ajoutée à la fin de chaque palier et est suivie d'une impulsion de même amplitude dans le sens inverse du balayage (Figure 30). Le courant est mesuré juste avant et juste à la fin de chaque impulsion. Sur la courbe est alors reportée une différence entre le courant direct (mesuré dans le sens de balayage) et le courant inverse (mesuré dans le sens inverse de balayage).

L'avantage de la SWV par comparaison à la voltammétrie cyclique, est une plus faible consommation des espèces électroactives, ce qui permet de diminuer les concentrations d'étude. De plus, la vitesse d'analyse est plus rapide et on observe une diminution des effets d'adsorption à la surface de l'électrode (Janeiro and Oliveira Brett 2004, Janeiro, Novak et al. 2007, Newair, Kilmartin et al. 2018). En effet, ce phénomène est à prendre en compte dans l'étude

électrochimique des composés phénoliques, car certains de leurs produits d'oxydation peuvent se polymériser à la surface de l'électrode et induisent une passivation de cette dernière, ce qui se traduit par une diminution de l'intensité du courant (Ferreira, Varela et al. 2006, Nady, El-Rabiei et al. 2017).

L'induction du courant dans le sens positif, immédiatement suivi par l'impulsion dans le sens contraire permet de voir immédiatement la réversibilité (ou non) de l'espèce formée lors de l'oxydation, ce qui permet d'observer de façon plus précise la réversibilité du transfert d'électron en un seul scan.

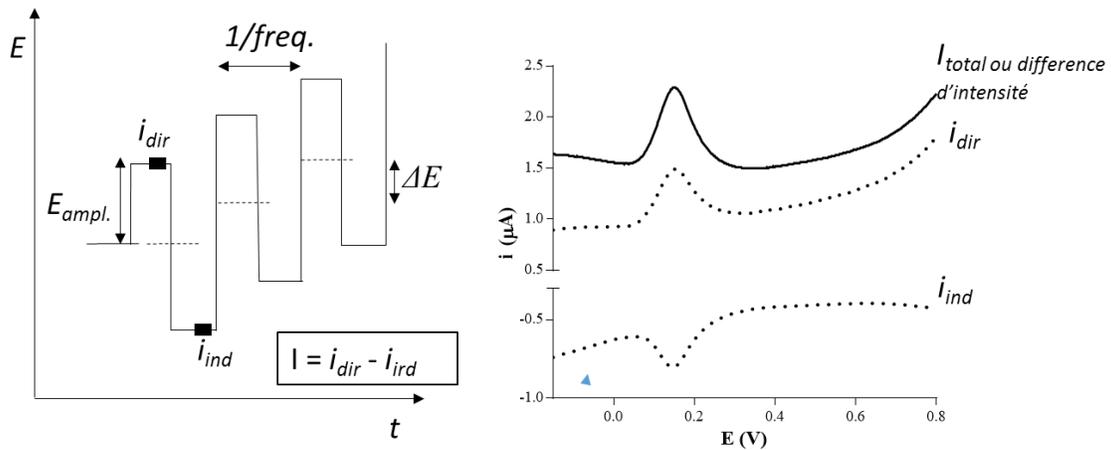


Figure 30 : Représentation schématique de l'application du potentiel en SWV et voltammogramme caractéristique d'une espèce réversible.

Chronoampérométrie :

La chronoampérométrie se distingue de la CV ou de la SWV, car ici, le courant est mesuré en fonction du temps à un potentiel fixe imposé. Le potentiel de départ imposé est un potentiel où le courant est nul en présence de l'espèce électroactive (potentiel où aucune réaction électrochimique n'a lieu). Puis, un saut de potentiel est généré pour atteindre un potentiel où la réaction électrochimique entre l'électrode et l'espèce en solution est la plus rapide (donc dans le cas où la vitesse de réaction est limitée par la diffusion des espèces à la surface de l'électrode). Ce potentiel est choisi au préalable par une analyse en CV ou en SWV. S'ensuit une mesure du courant pendant un temps θ . Le chronoampérogramme obtenu, $I = f(t)$, suit la loi de Cottrell et l'intensité du courant est proportionnelle à la concentration de l'espèce en solution (Figure 31).

$$i(t) = nFAC \left(\frac{D}{\pi t} \right)^{1/2}$$

Eq 20

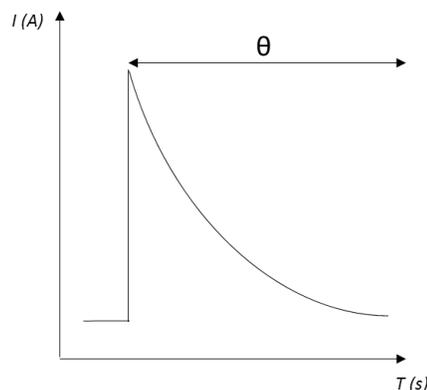


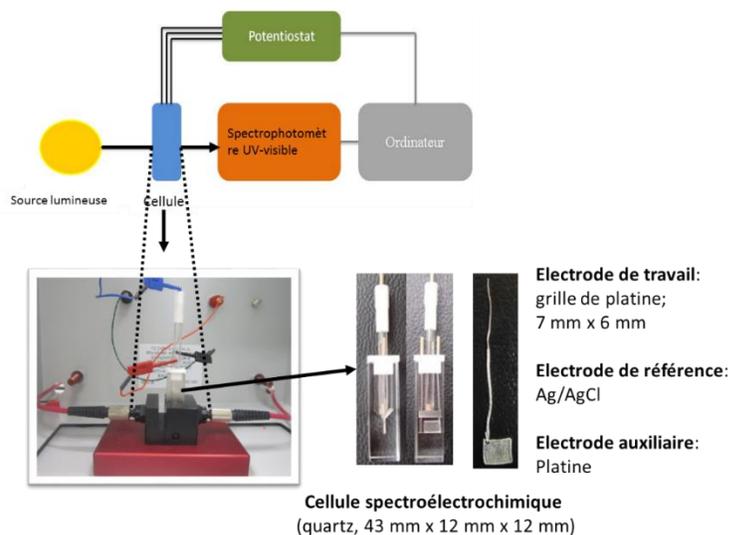
Figure 31 : Réponse du courant au saut de potentiel en fonction du temps.

La spectroélectrochimie

Cette méthode présente l'avantage de coupler la voltammétrie $i = f(E)$ ou la chronoampérométrie $i = f(t)$ à $E_{\text{fixé}}$ et la spectroscopie (spectroélectrochimie en temps réel *in situ*, Figure 32) (Kaim and Fiedler 2009). Elle permet d'observer immédiatement les modifications spectroscopiques associées à différentes valeurs de potentiels, et permet donc d'obtenir des informations sur les intermédiaires réactionnels, notamment les intermédiaires instables difficilement observables (Kaim and Fiedler, 2009). Dans cette étude, nous avons utilisé uniquement la spectroélectrochimie UV-Visible. Les composés phénoliques absorbent dans le domaine de longueurs d'ondes UV-Visible et disposent de groupement chromophores, ou de groupements insaturés de types C=C, C=O,..... Par exemple, certains flavonoïdes possèdent des bandes d'absorption à 370 et 265 nm caractéristiques de la conjugaison entre les noyaux B-C (système cinnamoyl) et A-C respectivement (système benzoyl) (Markham 1982). Ou encore la dimérisation de l'hydroxytyrosol qui peut être suivi par spectrophotométrie grâce à l'apparition d'un chromophore jaune-orange, absorbant à 390 nm (Napolitano, De Lucia et al. 2010). Cet outil est donc particulièrement intéressant pour observer les propriétés rédox des composés phénoliques à travers le déplacement des bandes d'absorption dans le domaine de l'UV-Visible. En effet, comme expliqué précédemment, la stabilité des quinones et des radicaux semi-quinones dépend

de la structure du composé natif ainsi que de son environnement. Cette instabilité relative nécessite des méthodes d'analyses rapides.

Plusieurs travaux ont permis d'observer les propriétés spectroscopiques des composés phénoliques en utilisant la spectroélectrochimie. L'oxydation des fonctions hydroxyles et la réorganisation moléculaire subséquente impliquent des mouvements spectroscopiques informatifs quant aux fonctions oxydées, aux intermédiaires réactionnels et aux produits d'oxydation formés (Petrucci, Astolfi et al. 2007, He, Yuan et al. 2009, Zhang, Wang et al. 2018). De plus, la solution électrolysée peut-être prélevée pour analyser les produits stables issus de l'oxydation.



66

Figure 32 : Montage expérimental pour la spectroélectrochimie et électrode de travail en grille de platine

Composés phénoliques et radical superoxyde

L'électrochimie est un outil puissant pour étudier le comportement rédox des composés phénoliques. De plus, il est possible de générer à l'électrode des radicaux instables comme le radical anion superoxyde sans adjuvant parasite ce qui permet de se rapprocher des conditions pouvant exister dans un système biologique.

Réactivité des composés phénoliques avec le superoxyde

D'après des études antérieures de voltammétrie cyclique, les monophénols semblent avoir une réactivité essentiellement acide-base vis-à-vis du superoxyde (Eq 21), tandis que les composés phénoliques dihydroxylés ou les polyphénols montrent de façon prépondérante une réactivité radicalaire (Eq 25). Bien que H_2O_2 est généré dans les deux cas (Eq 21 - Eq 26 Eq 26), le bilan

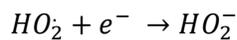
électronique va être modifié, deux électrons sont impliqués quand la réaction acide-base (Eq 22 et Eq 23) est mise en jeu et un électron dans la réaction radicalaire (Rene, Abasq et al. 2010). Il convient de prendre en compte que lorsque le transfert d'électron est mis en jeu, les différents mécanismes décrits au paragraphe IV.C.b peuvent être mis en jeu (Nematollahia, Rafieeb et al. 2009).

Cette différence de réactivité fait donc intervenir des intermédiaires réactionnels différents, ainsi que les propriétés de donneurs d'atome d'hydrogène des composés phénoliques. En se plaçant dans un contexte biologique, ces différents intermédiaires et les différents états d'oxydation des composés phénoliques peuvent entraîner des interactions particulières, dépendamment des composés phénoliques étudiés, avec les macromolécules et modifier la signalisation cellulaire.

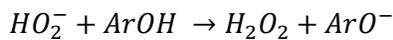
Réaction acide-base



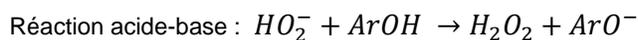
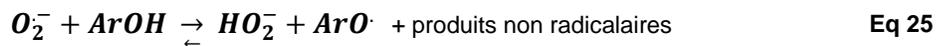
Eq 23



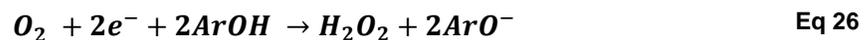
Eq 24



Réaction de transfert d'atome d'hydrogène (HAT)



Équation bilan



Moyens d'étude

Afin d'étudier la réactivité des composés phénoliques vs. $O_2^{\cdot-}$, plusieurs méthodes existent :

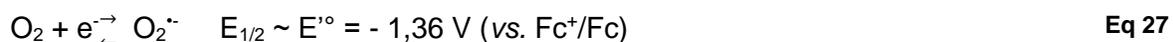
- le système xanthine /xanthine oxydase : l'enzyme xanthine oxydase transforme l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 en présence de son substrat, la xanthine. L'ajout de la catalase dismute le H_2O_2

et permet d'étudier spécifiquement la capacité de scavenging de l'O₂^{•-}. Les mesures sont effectuées par spectrophotométrie d'absorption à 295 nm.

Ce système utilise une réaction enzymatique. Le composé phénolique étudié peut alors agir de deux façons : soit par scavenging du superoxyde, soit par inhibition de l'enzyme. Dans la plupart des cas de son utilisation, ces deux activités sont confondues, les auteurs utilisent généralement le terme « d'inhibition de la xanthine oxydase » et ne laisse pas percevoir la capacité réelle du composé à scavenger le superoxyde. Bien que plusieurs études aient mis en avant la capacité de composés phénoliques à inhiber cette enzyme, notamment l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol ou encore l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique, en ce qui concerne les composés phénoliques issus de l'huile d'olive, cela ne reflète pas leur capacité à scavenger le O₂^{•-} (Flemmig, Kuchta et al. 2011, Zhao, Zhu et al. 2014, Vitale, Antenucci et al. 2017).

- La radiolyse de l'eau : le bombardement de l'eau par des électrons en présence d'oxygène provoque un effet Compton où l'énergie des électrons est absorbée par l'eau (H₂O) et forme O₂^{•-} et HO₂[•]. L'irradiation d'une solution aqueuse contenant du formiate de sodium permet de former spécifiquement des radicaux superoxydes dont la concentration (10⁻⁶ à 10⁻⁴ mol.L⁻¹) peut être déterminée par spectrophotométrie d'absorption (Baldacchino, Le Parc et al. 1998).

L'utilisation de l'électrochimie est encore peu utilisée pour étudier la réactivité d'une espèce en solution vis-à-vis du superoxyde. Pourtant, elle permet la génération à l'électrode de l'O₂^{•-} par réduction monoélectronique de l'oxygène couplée à l'analyse de la réactivité de ce radical en présence de substrat. M-L. Abasq et al. ont ainsi étudié la réactivité de nombreux substrats phénoliques par cette technique (Le Bourvellec, Hauchard et al. 2008, Rene, Abasq et al. 2010). L'étude en milieu aprotique oxygéné (DMF/Bu₄NPF₆) permet la stabilité du radical à l'échelle du temps de la mesure (quelques secondes) et l'oxydation monoélectronique du radical superoxyde en O₂ peut être observée sur le balayage retour (scan anodique) (Eq 27, Figure 33).



L'addition du substrat antioxydant dans le milieu réactionnel provoque une consommation du radical et par conséquent une diminution de l'intensité du courant d'oxydation d'O₂^{•-}, l'intensité du courant étant proportionnelle à la concentration (Eq 28). La droite relative à l'Eq 28 peut être tracée et permet de déterminer l'IC₅₀, qui correspond à la concentration de substrat antioxydant

pour laquelle 50 % d'O₂⁻ a été consommé dans une même échelle de temps. L' IC₅₀ renseigne sur les propriétés radicalophiles du substrat utilisé face au radical superoxyde.

$$(i_{pa}^0 - i_{pa}^S) / i_{pa}^0 = f ([ArOH])$$

Eq 28

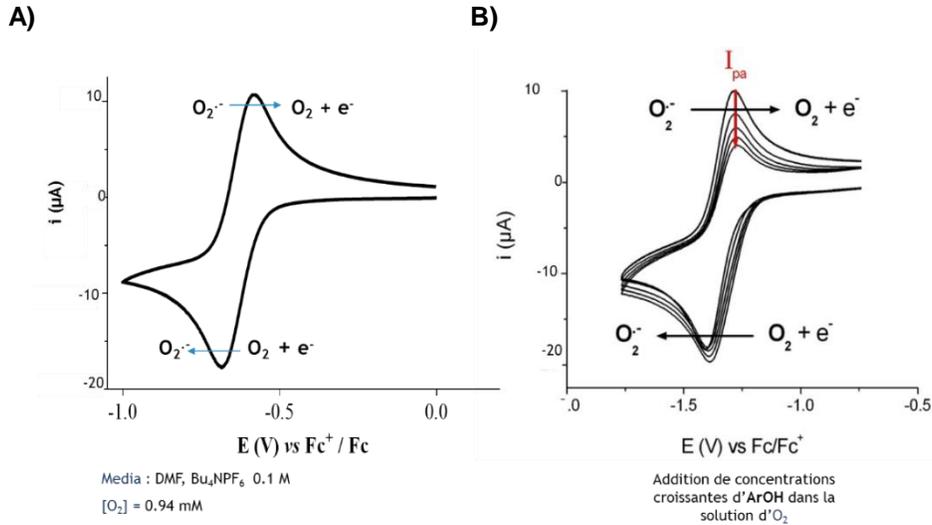
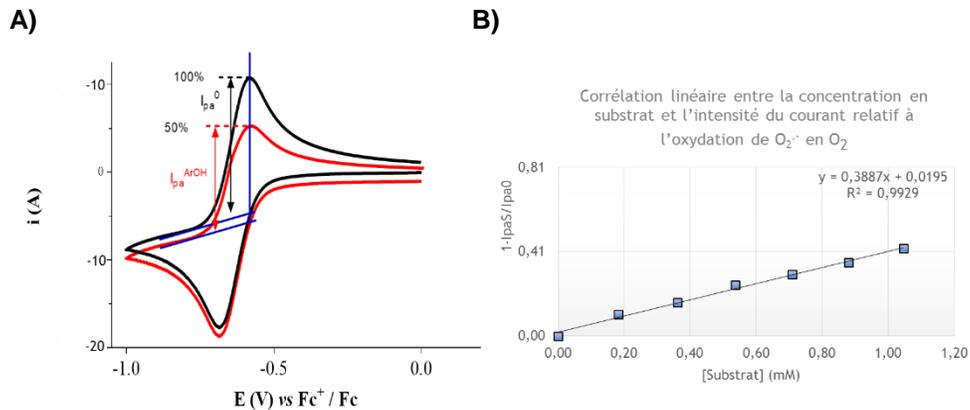


Figure 33 : Voltammogrammes de l'oxygène en milieu aprotique en l'absence ou en présence de ArOH

A) Voltammétrie cyclique de la réduction de l'oxygène en O₂⁻ et de sa ré-oxydation en O₂. B) Voltammétrie cyclique de l'oxygène en présence de concentrations croissantes de substrat antioxydant.



A) Mesure de l'intensité du courant nécessaire à l'oxydation d'O₂⁻ en O₂ avec et sans substrat. B) exemple de corrélation linéaire entre la concentration de substrat antioxydant et la diminution du de l'intensité du courant pour la détermination de l'IC₅₀

V. Combinaison de composés phénoliques

Comme exposé dans les précédents chapitres, les composés phénoliques possèdent de nombreuses propriétés biologiques résultantes de leurs propriétés physico-chimiques. Bien que

leurs mécanismes d'actions au niveau biologique soient étudiés depuis plus de deux décennies, leurs actions précises demeurent floues.

Les composés phénoliques sont généralement étudiés de manière individuelle afin de percer leurs mécanismes d'action au niveau biologiques. Cependant, dans les études de l'impact de l'huile d'olive pour limiter le déclin cognitif caractéristique de la MA et de la MP il faut prendre en compte que plusieurs familles de composés phénoliques sont présentes.

Certains auteurs suggèrent que les composés phénoliques devraient être considérés comme des cofacteurs avec des actions synergiques dans le cadre de la MeDi (Martínez-González Miguel, Gea et al. 2019) et proposent des approches combinant plusieurs composés phénoliques (Pratico 2008). Plusieurs études relatent aujourd'hui des actions synergiques entre composés phénoliques. Par exemple, l'activité antimicrobienne de composés phénoliques de l'huile d'olive se trouve augmentée lorsqu'ils sont combinés en comparaison de leurs effets individuels (Lee and Lee 2010). De même, l'association de l'oleuropéine, de la rutine, de l'acide caféique et de la vanilline augmente la capacité de piégeage du radical DPPH et de l'anion superoxyde *in vitro* (Lee and Lee 2010). Un autre exemple porte sur l'acide *p*-coumarique. Malgré sa faible capacité antioxydante, les capacités d'inhibition des radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+} sont augmentées lorsqu'il est associé à l'acide syringique (Guo, Sha et al. 2018). Des résultats similaires ont été observés lors de la combinaison de tous les composés phénoliques de l'huile d'olive (Benavente-Garciaa, Castillo et al. 2000). Ces effets synergiques relatifs aux capacités de piégeage des radicaux font intervenir directement leur structure. Les composés phénoliques possédants des potentiels rédox différents réduisent plus ou moins rapidement les radicaux, et donc s'oxydent plus ou moins rapidement, laissant éventuellement la place à des réactions de réduction, permettant la régénération des composés phénoliques aux potentiels rédox les plus faibles (Peyrat-Maillard, Cuvelier et al. 2003). Cependant le degré de régénération dépend de l'affinité pour les différents types de radicaux et de ce fait, les synergies entre composés phénoliques sont étroitement dépendantes de la structure des molécules, du milieu d'observation, de la polarité des molécules et du microenvironnement (Peyrat-Maillard, Cuvelier et al. 2003).

Les synergies entre composés phytochimiques ont été suggérées à plusieurs reprises, mais peu d'études reportent ce phénomène ou proposent un mécanisme sous-jacent (Williamson 2001, Benjamin and Lucio Ferreira 2003, Liu 2004, Ma, Zheng et al. 2009). Pourtant, plusieurs évidences montrent que les interactions positives entre composés phénoliques peuvent augmenter leur potentiel bioactif.

Dans le contexte des MND, la combinaison de composés phénoliques a précédemment montré des propriétés neuroprotectrices importantes. En effet, un mélange d'anthocyanines et d'anthocyanidines a montré des capacités à diminuer la toxicité de l'A β et de l'acroléine sur les cellules neuronales à des concentrations où les composés individuels n'ont montré aucun bénéfice (Belkacemi and Ramassamy 2015, Belkacemi and Ramassamy 2016). De plus, sur des souris transgéniques surexprimant l'APP humaine et donc présentant des plaques amyloïdes (TgCRND8), l'administration d'oleuropéine a généré une augmentation de l'autophagie dans le cerveau, tout comme l'administration d'un mélange de composés phénoliques de l'huile d'olive. Cependant, les souris traitées avec le mélange de composés phénoliques présentaient de meilleures performances cognitives que les souris contrôles, contrairement aux souris traitées avec de l'oleuropéine (Pantano, Luccarini et al. 2017).

Une combinaison synergique de composés phénoliques de l'huile d'olive n'a jusqu'à présent pas été étudiée, ou tout du moins avec des résultats encourageants pour lutter contre les MND.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La MA et la MP sont des maladies multifactorielles dont l'origine reste encore inconnue. Bien que l'âge soit le facteur prépondérant dans leur apparition, plusieurs facteurs de risques peuvent y être associés. C'est notamment le cas de l'alimentation. Actuellement, les traitements proposés ont pour principaux objectifs de traiter les symptômes issus de la neurodégénérescence plutôt que de lutter contre la cause profonde de la mort des neurones.

Indépendamment de l'origine de la MA ou de la MP, la caractéristique pathologique commune à ces deux maladies et à leurs dysfonctionnements cellulaires est le stress oxydatif. Que ce soit l'agrégation des protéines, les dysfonctionnements mitochondriaux ou la dérégulation des facteurs de régulation redox, ces altérations ont toutes en commun d'augmenter la production de radicaux libres. Il existe donc dans la MA et la MP un « réservoir d'inducteurs de stress oxydatif ». Cependant, l'utilisation d'antioxydants de manière isolée ne s'est pas révélée efficace. Il convient de développer des stratégies permettant de cibler la production de radicaux libres à différents niveaux cellulaires pour enrayer les différentes voies d'induction de stress oxydatif.

L'adhésion à la diète MeDi en lien avec la consommation d'huile d'olive extra-vierge riche en composés phénoliques montre des résultats encourageants pour prévenir l'apparition et diminuer la progression des maladies neurodégénératives chez les personnes âgées. Plus particulièrement, l'oleuropéine et son dérivé l'hydroxytyrosol, le tyrosol ou encore l'acide *para*-coumarique ont montré des propriétés intéressantes pour lutter contre la mort des neurones induite par le stress oxydatif.

Les composés phénoliques représentent une vaste famille de composés phytochimiques aux propriétés biologiques multivalentes réelles. Leur variété structurale en fait des composés présentant une diversité d'activités, notamment grâce à leur caractère antioxydant. Bien que leurs propriétés réductrices ne soient pas les seules propriétés entrant en jeu dans leur mode d'action, les mécanismes d'oxydation sont multiples et peu caractérisés dans les systèmes biologiques. Or, en conditions oxydatives, ces composés s'oxydent et peuvent former différents produits dont la structure va dépendre du système dans lequel ils sont étudiés ainsi que des espèces présentes. L'impact cellulaire de ces produits issus de l'oxydation des composés phénoliques est encore peu étudié, car le devenir de ces composés, dans le contexte d'un métabolisme oxydatif, reste obscur. C'est pourquoi l'étude de ces métabolites permettrait d'approfondir les connaissances sur leurs mécanismes d'actions à l'échelle moléculaire.

De plus, la combinaison de plusieurs composés phénoliques peut, dans certains cas, augmenter leur caractère antioxydant *in vitro*, mais aussi potentialiser leurs effets neuroprotecteurs. Or, dans ce contexte, les principaux composés phénoliques de l'huile d'olive ont, à ce jour, avant tout été étudiés de manière isolée.

Compte tenu des connaissances actuelles sur les composés phénoliques de l'huile d'olive, de leurs mécanismes d'action et d'oxydation, associée aux caractéristiques cellulaires de la MA et de la MP, nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique potentialise leurs effets neuroprotecteurs à travers leurs mécanismes d'oxydation et en lien avec la production des métabolites associés.

Objectif général : Déterminer l'existence d'une potentialisation des effets de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *para*-coumarique, une fois combinés, en vue de lutter contre la mort neuronale associée au stress oxydatif et identifier les mécanismes physico-chimiques, cellulaires et moléculaires sous-jacents.

La particularité de ce travail réalisé en cotutelle de thèse est de proposer une approche pluridisciplinaire intégrant des composantes biologiques, à travers l'utilisation d'outils de biologie cellulaire et moléculaire, et des questions relevant de la chimie, en s'appuyant sur des outils électrochimiques permettant de mimer les réactions d'oxydations et de transfert d'électrons en solution modèle. L'analyse du profilage chimique de standard(s) ou de mélange, soumis ou non à une oxydation par voie électrochimique, sera également entreprise par un outil de type LC-ESI-MS². La dernière partie de ce travail consistera en une étude préliminaire du devenir des composés phénoliques, étudiés lors de ces travaux, dans des cellules neuronales en conditions basales et soumises à un stress oxydatif.

Objectifs spécifiques :

- 1- Notre premier objectif est de confirmer ou d'infirmer la potentialisation des effets de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique et du tyrosol, en combinaison

- équimolaire, en étudiant leur réactivité vis-à-vis d'EROs endogènes ainsi que leurs propriétés neuroprotectrices en condition cellulaire.
- 2- Notre second objectif est d'observer le comportement de ces composés phénoliques en conditions oxydatives, en utilisant des outils électrochimiques en solution simplifiée, et de comparer les produits issus de l'oxydation des composés individuels ou en mélange.
 - 3- Le dernier objectif de ce travail est d'observer la différence de métabolisation des composés phénoliques par les cellules neuronales en conditions basales ou suite à l'induction d'un stress oxydatif. De plus, nous souhaitons déterminer si les métabolites issus de l'oxydation des composés phénoliques observés en solutions modèles sont produits à l'échelle cellulaire.

CHAPITRE 2

SYNERGISTIC PROPERTIES OF BIOAVAILABLE PHENOLIC COMPOUNDS FROM OLIVE OIL: ELECTRON TRANSFER AND NEUROPROTECTIVE PROPERTIES.

Statut de l'article : soumis dans le journal *Nutritional Neuroscience* (8 avril 2019), actuellement en révision.

Auteurs de l'article : Morgane Lambert de Malezieu^{a,b,d}, Patricia Courtel^a, Lekha Sleno^c, Marie-Laurence Abasq^{a,*}, Charles Ramassamy^{b,d,*}

^aUniv Rennes, CNRS, ISCR [(Institut des Sciences Chimiques de Rennes)] – UMR 6226, F-35000 Rennes, France.

^bINRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada.

^cUniversité du Québec à Montréal, Chemistry Department, PO, Montreal, Canada.

^dINAF, Quebec, QC, Canada

I. Résumé et objectifs de l'article 1 :

Les composés phénoliques de l'huile d'olive sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et leurs capacités neuroprotectrices. Cependant, leurs réactivités envers les différentes espèces réactives de l'oxygène sont étroitement dépendantes de leur structure et peuvent engager plusieurs mécanismes complémentaires. Nous avons émis l'hypothèse qu'une combinaison équimolaire des composés phénoliques les plus abondants de l'huile d'olive, structurellement différents, pouvait potentialiser la somme de leurs effets antioxydants individuels.

À travers l'utilisation d'outils électrochimiques, nous avons comparé leurs réactivités envers deux des EROs les plus abondants dans les cellules, à savoir le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La combinaison de l'oleuropéine et de deux monophénols, l'acide *p*-coumarique et le tyrosol (Mix1), a montré une réactivité plus importante que la combinaison de l'hydroxytyrosol, la moitié catéchol de l'oleuropéine, avec les deux monophénols (Mix2) envers les EROs étudiés. De plus, le Mix1 a démontré

une capacité à diminuer la mort des cellules neuronales SK-N-SH challengées avec le H₂O₂ ou le paraquat, deux inducteurs de stress oxydatif, à des concentrations où les composés individuels n'affichaient aucune protection. Ces effets neuroprotecteurs ont été appuyés par une diminution de la production d'EROs intracellulaires, une diminution des niveaux de protéines carbonylées et une prévention de l'activation des facteurs de transcription rédox Nrf2 et Nf-κB.

Nos résultats démontrent que l'association équimolaire de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique et du tyrosol potentialise leur efficacité neuroprotectrice contre les dommages induits par le stress oxydatif. Ces données suggèrent que cette combinaison de composés phénoliques pourrait limiter la mort des neurones médiée par le stress oxydatif dans la MA ou la MP.

II. Contribution de l'étudiant à l'article 1 :

L'article a été soumis dans *Nutritional Neuroscience*, un journal qui permet de faire le lien entre les sciences de l'alimentation et les neurosciences. L'association des composés phénoliques a été imaginée par C. Ramassamy, puis j'ai réalisé les différentes expérimentations décrites dans cette publication. Le travail portant sur la réactivité des composés phénoliques a été réalisé à l'Université de Rennes 1, en France, avec l'aide de l'assistante de recherche Patricia Courtel pour les mesures électrochimiques et sous la direction de M.L. Abasq. J'ai réalisé l'étude de neuroprotection à l'INRS Centre Armand-Frappier au Québec. J'ai également réalisé les figures, l'analyse et la compilation des résultats. J'ai écrit l'article qui a ensuite été révisé et corrigé par la Maître de Conférences Marie-Laurence Abasq puis le Professeur Charles Ramassamy et enfin la Professeure Sophie Tomasi pour relecture finale.

III. Article 1

Synergistic properties of bioavailable phenolic compounds from olive oil: electron transfer and neuroprotective properties.

Abstract:

Phenolic compounds from olive oil (ArOH-EVOO) are recognized for their antioxidant and neuroprotective capacities. As their reactivity towards reactive oxygen species (ROS) depends on their structure and could implicate different complementary mechanisms, we hypothesized that their effects could be enhanced by an equimolar combination of some of the most abundant ArOH-EVOO.

Using electrochemical methods, we have compared their reactivity towards two abounding ROS, the hydrogen peroxide and the superoxide anion radical. The mixture containing oleuropein and two monophenols, *p*-coumaric acid and tyrosol (Mix1), was more efficient than the mixture containing hydroxytyrosol, the oleuropein catechol moiety, and the two monophenols (Mix2). On neuronal SK-N-SH cells challenged with H₂O₂ or Paraquat, low concentrations (0.1 μM and 1 μM) of the Mix1 were able to decrease neuronal death. These neuroprotective effects were supported by a decrease in intracellular ROS, in the protein carbonyl levels and the prevention of the activation of the redox sensitive factors Nrf2 and NF-κB. These intracellular effects were supported by the demonstration of the internalization of these ArOH-EVOO into neuronal cells, evidenced by LC-HRMS.

Our results demonstrated that the combination of these ArOH-EVOO could enhance their efficiency in the protection of neuronal cells against ROS-induced damages. These data suggest that they could delay neuronal death in neurodegenerative diseases related to oxidative stress such as AD and PD.

Keywords:

Neuroprotection; Neurodegenerative diseases; Olive oil phenolic compounds; Oxidative stress; Superoxide anion radical; Cyclic Voltammetry.

Introduction

Strong evidences supports the early role of oxidative damages in mild cognitive impairment (MCI) patients, in Alzheimer's (AD) and Parkinson's diseases (PD) (1, 2). In this context, some phenolic compounds (ArOH) from fruits and vegetables are particularly relevant due to their abilities in decreasing reactive oxygen species (ROS) and oxidative damages, leading to the prevention of neuronal death (3).

The adherence to the so-called "Mediterranean diet" is characterized by a great consumption of extra virgin olive oil (EVOO). EVOO may be associated with the decrease risk of cognitive impairment or dementia such as those related to AD and PD (4, 5). The beneficial effects of EVOO have been attributed to its high ArOH content. Indeed, the concentration of ArOH in EVOO can reach 200 to 1200 mg /kg combining at least twenty different compounds, including secoiridoid derivatives, phenyl alcohols and hydroxycinnamic acids among others (6).

Neuroprotective properties of ArOH-EVOO have been attributed, at least in part, to their direct ROS scavenging properties and to their indirect antioxidant mechanisms. The first one were studied in abiotic systems involving electron or hydrogen atom transfer mechanisms (7-10) and mainly attributed to their hydroxyl group(s) (Fig.1). However, depending on the ArOH structure, some other mechanisms remain to be investigated (8, 11, 12), particularly when several ArOH are combined. We and others have previously demonstrated that the combination of some phenolic compounds could enhance their antioxidant (7, 8) and neuroprotective capacities (13).

Some *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated the potential of some ArOH-EVOO to counteract the deleterious effects of aging processes like oxidative stress and inflammation (14). For instance, oleuropein (Ole), its derivative hydroxytyrosol (OH-Tyr), and tyrosol (Tyr), the three abundant and brain bioavailable ArOH-EVOO (15) were able to attenuate oxidative stress on neuronal cells (3, 16). They could counteract AD and PD neurotoxins, like amyloid- β peptide (3), MPP⁺ (17) and glutamate induced-neuronal death (16), through the modulation of redox-sensible transcription factors and the associated endogenous antioxidant phase-II enzymes expression and activities. Moreover, the hydroxycinnamate derivative *para*-coumaric acid (*p*-Cou) was competent, as Ole, for decreasing oxidative injuries and neuronal loss in the hippocampus of rat, one of the first area affected by neuronal loss in AD (18-20).

The aim of our study was to examine whether the combination of a catechol, Ole (Mix1) or OH-Tyr (Mix2), with two monophenols, Tyr and *p*-Cou, in equimolar proportions potentiated their individual reactivities towards two ROS species, H₂O₂ and O₂^{•-}, and to explore their synergistic neuroprotective properties against H₂O₂- or Paraquat-induced neuronal death in SK-N-SH cells.

Material and Methods

Reagents

Commercially available chemicals were used without any further purification. *N,N*-dimethylformamide extra dry ([H₂O] ≤ 0.005 %, stored over molecular sieves), tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Bu₄NPF₆), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), were purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Paraquat was purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Tyrosol, *para*-coumaric acid, oleuropein, hydroxytyrosol, hydrogen peroxide, cell survival assay Tox-8-Resazurin-based, Minimal Essential Medium Eagle (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, bovine serum albumin (BSA) and anti-DNP rabbit polyclonal antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Prolong gold antifade reagent was from Life Technologies (ON, Canada). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Total protein extraction kit and BCA protein estimation kit were obtained from Active Motif (California, USA) and from Pierce Biotechnology (Rockford, USA), respectively. SK-N-SH cells line was obtained from American Type Cell Culture (ATCC, Rockville, MD, USA). Rabbit polyclonal anti-phospho-Nrf2 (Ser 40) (bs-2013R) antibody was from Bioss Antibody (Woburn, MA, USA). Rabbit monoclonal anti-NF-κB p105/p50 (ab32360) antibody was from Abcam (Cambridge, MA, USA). Mouse monoclonal anti-GAPDH (≠ MAB374) antibody was from Chemicon (Millipore, Mississauga, ON, Canada). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Sigma-Aldrich, Inc. Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated (≠A11008) antibody was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). MilliQ water was used for all the experiments.

Phenolic solution preparation

ArOH-EVOO were first dissolved in ethanol (final concentrations do not exceed 0.05 % ethanol for cell culture and 5 % ethanol for electrochemical assays), then diluted in

adequate solution. Stock solution of Ole and OH-Tyr were aliquoted, saturated with nitrogen and stored at -20 °C. The Mixes are in equimolar proportion of Ole, Tyr and *p*-Cou (Mix1) or OH-Tyr, Tyr and *p*-Cou (Mix2). The Mix1 at 1 μM corresponds to 0.333 μM of each ArOH and 278.13 ng/mL of total ArOH.

H₂O₂ inhibition and DPPH free radical scavenging assays

The free radical scavenging activity was measured by DPPH as previously described (21). The real-time detection of H₂O₂ was measured with the Apollo 4000 free radical analyzer (WPI Inc.) equipped with a specific H₂O₂ electrode as previously described (1). Briefly, the ArOH-H₂O₂ inhibition capacity was evaluated by the measurement of the current intensity generated by 10 μM of H₂O₂ with or without ArOH. The ratio of total ArOH/H₂O₂ was 1/200.

Reactivity against superoxide radical using cyclic voltammetry

Voltammetry experiments were carried out on a dual potentiogalvanostat PGSTAT100 (Autolab instrument, Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands), with a thermostated three-electrode cell containing a glassy carbon disk working electrode (GCE) (Ø2mm), a platinum wire counter electrode and a reference electrode, Ag/AgCl in EtOH saturated by LiCl in an aprotic medium. Before each measurement, the GCE was polished using 0.3 μm alumina. The reactivity was assessed as previously described (22, 23). To avoid interferences, we have checked that none ArOH is reducible in the potential range of O₂/O₂^{•-} system. Current intensities i_{pc} and i_{pa} are proportional to O₂ and O₂^{•-} concentrations, respectively. Following the addition of increasing concentrations of ArOH in DMF oxygen solution ([O₂] = 0.94 mM), the initial i_{pa}^0 intensity decreased gradually corresponding to the O₂^{•-} consumption (i_{pa}^S). A linear correlation ($(i_{pa}^0 - i_{pa}^S)/i_{pa}^0$ vs. [ArOH]) allows the determination of an IC₅₀ value, referring to ArOH concentration needed to reduce by 50 % the initial $i_{pa}^0(O_2^{\bullet-})$. IC₅₀ was obtained on a minimum of five point linear plots in three replicates.

Cell culture, Cell viability assay and intracellular ROS detection

SK-N-SH cells were maintained in MEM supplemented with 10 % (v/v) FBS, 100 μg/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 1% sodium pyruvate (1 mM) in a humidified incubator at 37 °C with 95 % O₂ and 5 % CO₂. 24 h after seeding, cells were starved for 1 hour before any treatment. Cell survival was assessed 24 h after the treatments, using the Tox-8 (Resazurin-based) kit following the manufacturer's instructions. Intracellular ROS

was assessed by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (H₂-DCF-DA) as previously described (13).

Western Blot analysis and protein carbonyls detection

Total proteins from SK-N-SH cells were extracted with a lysis buffer containing a cocktail of protease inhibitors. BCA test was used to protein quantification. Protein cell lysates were separated on 10 % SDS-PAGE gels and transferred into PVDF membranes using a Trans-Blot Turbo System (Bio Rad).

For protein carbonyls detection, membranes were derivatized using 1 mM DNPH in 2M HCl as previously described (1). Detection was realized with Immobilon Western Chemiluminescent-HRP Substrate, the bands were visualized and quantified by densitometric analysis using luminescent imaging system FluorChem. Membrane coloration with blue Coomassie was used as protein loading control. Data are expressed as means of normalized proteins over the control group, considered as 100 % \pm SEM. NF- κ B and GAPDH were detected with primary antibodies anti-NF- κ B p105/p50 (1/1000) and anti-GAPDH (1/20000). Data are expressed as means of normalized proteins over the control group, considered as 100 % \pm SEM.

Immunocytochemistry by fluorescence microscopy

SK-N-SH cells were cultured on cover slips coated with poly-D-lysine (1.5×10^4 cells/well) in 24-well plates as previously described (13). Cells were starved for 1 h before any treatment. Nrf2 was detected with primary antibody anti-Nrf2 (1/200) followed by an incubation with the anti-rabbit Alexa Fluor® 488-conjugated secondary antibody (1/200). Nucleus were stained with 1 μ g/ml DAPI for 10 min at RT. Images were captured using the SensiCam High Performance camera under the DAPI and the FITC filters detection using both 10x and 40x lenses.

Fluorescence data analysis

Only the overlapped green with the blue fluorescence was quantified. Hundreds of cells from several images, of at least three independent experiments, were used for quantification by Image J 1.49v software (National Institute of Health, USA). Results are expressed as means of normalized fluorescence intensity over the control group considered as a 100 % \pm SEM.

Extraction and LC-MS Analysis of intracellular ArOH

After 30 min of treatment, the medium was removed and adherent cells were washed with cold PBS then quenched with cold methanol. After solvent evaporation under nitrogen, ArOH were extracted from cells pellet with a solution containing methanol/water/phosphoric acid 4 % (80/18.5/1.5, v/v/v) and centrifuged three times (15 min, 9000 rpm). After solvent evaporation under vacuum (3h, RT), pellets were reconstituted in methanol 10 %, sonicated 30 sec then loaded onto SPE cartridges (Oasis HLB (60 mg, 3 ml)) from Waters (Milford, MA). After washing with water, the elution was carried out with methanol (1 ml), followed by drying and reconstitution in 10 % acetonitrile (100 μ l). Samples were stored at -20 °C prior to analysis by LC-MS.

After thawing, samples were transferred to HPLC vials for LC-HRMS analysis. Phenolic compounds were separated using a reverse phase column Gemini-NX (5 μ m, 100 mm \times 4.6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD, USA) at 40 °C with gradient elution. Mobile phases were water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1 % formic acid. The gradient was linearly increased from 1 % B to 40 % B within 20 min, then to 90 % B within 5 min. A flow rate of 1.0 mL/min was used and 10 μ L of sample was injected. HRMS data were obtained using a Sciex TripleTOF 5600 (quadrupole–time-of-flight) instrument with electrospray ionization (ESI) using a DuoSpray ion source in negative mode. Source parameters were as follows: ion spray voltage, -4500 V; temperature, 450 °C; curtain gas, 35 psi; GS1 and GS2, 50 psi; declustering potential, -60 V. MS data were obtained from m/z 100-1200. Raw data were processed using MultiQuant 3.0.2 and visualized using PeakView 2.2 (Sciex). High resolution extracted ion chromatograms (within 0.01 Da) of accurate masses for deprotonated $[M-H]^-$ molecules were used for identification of Ole, Tyr or *p*-Cou in standards and samples.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate from at least three separate experiments and results were expressed as mean \pm SEM. Data were statistical analyzed by ANOVA followed by the Dunnett's-t test or the Tukey's multiple comparisons test when different pairs were compared together. Differences were considered significant when p -values < 0.05 . Analyses were performed using GraphPad Prism software.

Results

ROS and DPPH scavenging capacities of the Mixes

The reactivity of ArOH-EVOO, Mix1 (Ole, *p*-Cou, Tyr) and Mix2 (OH-Tyr, *p*-Cou, Tyr) were studied through electrochemical methods (hydrogen peroxide and superoxide radical) and the conventional DPPH method.

H₂O₂ inhibition capacities of the Mixes

H₂O₂ is a non-radical oxidizing species highly involved in neuronal oxidative injuries. Using a H₂O₂-specific electrode, we showed that a low ratio 1/200 of ArOH/H₂O₂, Ole, Tyr, *p*-Cou, OH-Tyr or the Mix2 did not lower significantly the H₂O₂ concentration while the Mix1 decreased the H₂O₂ concentration by 33.4 %, from 10 mM to 6.6 mM (Fig.2A). These results suggest the particular interest of the whole Ole scaffold structure in combination with the monophenols.

Mixes reactivity against superoxide

Superoxide O₂^{•-} is the first radical formed by oxygen reduction in oxidative conditions. The reactivity of individual ArOH-EVOO towards O₂^{•-} was compared to the reactivity of individuals ArOH-EVOO, the Mix1 and Mix2 by cyclic voltammetry (CV) (22, 23). Ole, OH-Tyr and *p*-Cou showed a reactivity in a narrow range with an IC₅₀ ≈ 1.13-1.24 mM, while Tyr is four time less reactive (IC₅₀ = 4.2 mM) (Fig.2-B). When these ArOH are mixed together, the IC₅₀ of the Mix1 is significantly lower than the Mix2 (Fig.2-B). These data suggest that the ability of the Mix1 to scavenge O₂^{•-} is higher than the Mix2.

The oxygen CVs (O₂-CV) presented an oxygen reduction prepeak with incremental additions of Ole and OH-Tyr (dotted arrows on Fig.2-C), slightly visible with *p*-Cou and the Mix1. The presence of these prepeaks was found to be correlated with a higher reactivity (22), which is in agreement with the IC₅₀ ranking. Moreover, a well-defined anodic peak (*E*_{pa}) emerges on the reverse scan of Tyr, at +0.25 V, and in a lower extent on the reverse scan of *p*-Cou (black arrows on Fig.2-C₃-C₄, D). According to the known mechanisms involved in the reactivity between monophenols and O₂^{•-} (Figure 2.D), it is attributing to the direct formation of a phenolate in the diffusion layer. Several peaks are visible on the reverse scan of Ole (*E*_{pa} -0.15 V and +0.08 V) and OH-Tyr (*E*_{pa} -0,21 V; +0.03 V and +0.29 V), attributed to the oxidation of compounds produced following the reaction between the *o*-diphenols and the superoxide. It should be noted that none of these peaks are present on the oxygen CVs in presence of the Mixes, but new oxidation peaks emerged at -0.15 V and +0.08 V for the Mix1 and -0.23 V and +0.06 V for the Mix2.

DPPH quenching abilities

As we have pointed a difference of the reactivity between the two Mixes towards the anion radical superoxide $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , we have then investigated their ability to scavenge the DPPH radical. Consistent with the results described above, the Mix1 was five time more reactive than the Mix2 with EC_{50} of 308 μM and 1540 μM , respectively.

Synergistic neuroprotective study of the Mix1

As the ability of the Mix1 to scavenge different ROS species was higher than the Mix2, for the cellular studies, we have thus focused on the Mix1.

The Mix1 preserves neuronal cells against H_2O_2 - or Paraquat-induced toxicity

The Mix1, from 0.1 to 10 μM , was not cytotoxic to SK-N-SH neuronal cells after 24 h of treatment (Fig.3-A). Interestingly, at 0.1 and 1 μM , the Mix1 formulation was able to protect SK-N-SH neuronal cells challenged with H_2O_2 (Fig.3-B), while individually, none of these compounds was able to protect cells between 0.1 and 10 μM (Fig.3-C). The Mix1 was also efficient to protect neuronal cells against PQ (Fig.3-D), an $O_2^{\bullet-}$ generator and a pesticide related to PD etiology. However, higher concentrations of the Mix1 (5 and 10 μM), emphasize the toxicity of H_2O_2 and PQ. Based on these data, we used 0.1 and 1 μM of the Mix1 for the following experiments.

Effect of the Mix1 on H_2O_2 -induced intracellular oxidative stress in SK-N-SH cell line.

The neuroprotective capacity of the Mix1 may be due to different mechanisms such as the reduction of oxidative injuries through the inhibition of intracellular ROS production. The Mix1 at 1 μM was able to reduce by 15% the intracellular ROS levels but not with lower concentrations (Fig.4-A). However, from 0.1 μM , the Mix1 was able to prevent the increase in protein carbonyls in cells challenged with H_2O_2 after 1 and 24 h of treatment (Fig.4-B). These results indicate that the Mix1 was able to decrease ROS levels and protect cells against oxidative damages.

The Mix1 modulates the redox inducible transcription factors

The subunit p105 of NF- κB , the precursor of the DNA-binding subunit p50, is a key factor involve in the cellular stress response and contribute to the expression of pro-inflammatory and pro-oxidative genes. Our results demonstrated that the increase of the subunit p105 of NF- κB following H_2O_2 treatment in neuronal cells is restored from 0.1 μM of the Mix1 formulation, while the Mix1, without H_2O_2 , did not have any effect (Fig.5-A).

We have then analyzed the effects of the Mix1 formulation on the nuclear translocation of Nrf2. Our results demonstrated that the presence of the Mix1 reduced the Nrf2 nuclear level induced by H_2O_2 (+170 % compared to non-treated cells, Fig.5-B-C), in a dose

dependent manner, reaching 133 % and 123 % with 0.1 and 1 μM concentration of the Mix1, respectively. No modification of nuclear Nrf2 level was observed when cells were treated with the Mix1 without H_2O_2 .

Phenolic compounds are internalized by neuronal cells

The uptake of ArOH-EVOO by neuronal cells were analyzed by LC-ESI-QTOF. Ole, *p*-Cou and Tyr detection was achieved by accurate mass measurements of deprotonated molecules at m/z 539.177, 163.040, and 137.060, respectively. From 30min of treatment with the Mix1, with or without H_2O_2 , the three ArOH were detected in intracellular extracts (Fig.6A-B). These results confirm that the Mix1 are available to act by intra-neuronal pathways.

Discussion

The chronic administration of enriched ArOH-EVOO results in amelioration of learning, memory and reverses of age-related dysfunctions during ageing on animal models, which was not observed with the consumption of EVOO (24). EVOO contains more than twenty ArOH and the synergic effects related to the antioxidant and neuroprotective activity of the most representative compounds Ole, OH-Tyr, Tyr or *p*-Cou remains to be demonstrated. In this study, we found that blending Ole, *p*-Cou, and Tyr, in equimolar proportions (Mix1), increased the reactivity towards ROS compared to the individual molecules while the mix of OH-Tyr with *p*-Cou and Tyr (Mix2) was less efficient. These results indicate that a synergic effect on ROS scavenging was obtained only with a specific combination of some ArOH-EVOO. In addition, the Mix1 was shown to be neuroprotective against two different ROS through the improvement of the cell redox state. Finally, we found that they were detected on neuronal cells fractions.

The oxidative mechanisms of these ArOH are intrinsically linked to their neuronal activities.

The oxidative conditions is mainly regulated by electron transfer reactions, which may impact the redox chemistry of the ArOH. Therefore, we have examined whether a mixture of ArOH could modify or enhance the reactivity towards the superoxide radicals and H_2O_2 , two biological ROS induced following oxidative toxins like PQ.

The superoxide-ArOH reactivity may follow two main mechanisms, a proton transfer (PT) and a hydrogen atom transfer (HAT), both can be concomitant (Fig.2-D) (22, 23). The HAT mechanism leads to the formation of the radical species ArO^{\bullet} which is less reactive and

toxic than ROS, because of its stabilization by resonance effects. By their conjugated structure and lower oxidation potential (E_{pa}), the *o*-diphenols display more reducing abilities than the monophenols, and therefore more inclined to follow a HAT mechanism. In aprotic media, the reaction between monohydroxylated ArOH and $O_2^{\bullet-}$ was described as a PT pathway (22).

The CVs of Ole, OH-Tyr, *p*-Cou and Tyr confirmed that the oxidation of Ole and OH-Tyr was easier by 0.4V than *p*-Cou and Tyr. They display a reversible two-electron and two-proton oxidation mechanism leading to *o*-quinone formation (Table S1, Fig. S1-S2) (25) (8). Differences in the oxygen CV shape were noticeable depending on the ArOH in solution. Tyr is the sole compound showing a definite phenolate anodic peak on the oxygen CV attesting a major PT mechanism between Tyr and $O_2^{\bullet-}$ (22, 23). It is consistent with its lowest IC_{50} , attesting its weak reactivity towards $O_2^{\bullet-}$ (12). Although *p*-Cou oxidizes at a similar potential than Tyr, it did not display a significant phenolate anodic peak. However, it presents an oxygen reduction prepeak, related to a faster reactivity (22, 23) and confirmed by its IC_{50} value which is close to the catechol ones. This can be explained by the carboxylic group on *p*-Cou ($pK_a=4.3$) which allows a faster PT reactivity than a phenol group ($pK_a=8.9$ and 10 , respectively for *p*-Cou and Tyr) (26), although a competitive HAT cannot be excluded neither. The addition of Ole and OH-Tyr produced a more pronounced prepeak on the O_2 -CVs, which is consistent with their highest IC_{50} values. Based on our previous work (22), Ole and OH-Tyr are likely reacting through a predominant HAT mechanism with $O_2^{\bullet-}$, involving their reducing properties.

Our objective was to examine how the reactivity would be affected by combining different ArOH. The reactivity of the Mix1 and Mix2 was different. Only the Mix1- O_2 -CV shows a relevant prepeak coherent with a lower IC_{50} value than the Mix2. Considering the synergistic effects, we have recalculated the theoretical values with equimolar proportions of ArOH, expecting an IC_{50} of 2.19 and 2.21 mM, respectively, for Mix1 and Mix2. As the experimental IC_{50} were 1.36 and 1.57 mM, respectively, we can hypothesize that the weak reactivity of Tyr is compensated in the Mixes, likely by the occurrence of coupling reactions. The absence of the phenolate oxidation peak on the CVs of the Mixes strengthens this hypothesis and demonstrates modifications of the reactivity towards $O_2^{\bullet-}$, and probably towards other ROS species.

Moreover, the Mix1 was more efficient than the Mix2 containing the OH-Tyr moiety of Ole although both have a catechol function and approximately the same E_{pa} and $O_2^{\bullet-}$ - IC_{50} values. This is strengthened by other types of ArOH reactivity as for the DPPH \bullet test, and

more by the H₂O₂-inhibition assay which demonstrates that only the Mix1 was able to significantly decrease the H₂O₂ concentration. These observations reveal that independently of their catechol structure, Ole and OH-Tyr substituents electronic and steric effects impact the antioxidant properties of these Mixes, as previously suggested (9).

By displaying new reactivity mechanisms, Mixes may enhance antioxidant properties compared to individual ArOH. Indeed, coupling reactions may allow the regeneration of an oxidized ArOH to its native form through the oxidation of a second ArOH with a lower redox potential as described between ArOH with different redox potential (8). This type of reaction could improve the antioxidant capacities of the combined ArOH through a succession of chemical reactions

The combination of Ole, p-Cou and Tyr leads to a synergistic neuroprotection against neuronal oxidative stress

We found that neither Ole, Tyr or *p*-Cou individually were able to protect SK-N-SH cells from H₂O₂ induced-toxicity, while mixed together, these three ArOH-EVOO protect neuronal cells against H₂O₂ and PQ-induced toxicity. These results are in accordance with the *in vitro* H₂O₂ inhibition assay which demonstrated that, in our conditions at a very low ratio ArOH/H₂O₂, these ArOH-EVOO could scavenge H₂O₂ only when they are combined together. The decrease of intracellular carbonyl protein level, even after only one hour of treatment, attests that the Mix1 containing Ole, Tyr and *p*-Cou was able to decrease the oxidative stress-induced neuronal death by restricting intraneuronal ROS generation and injuries.

Moreover, beyond the direct scavenging properties of the Mix1, our results demonstrated that, not only the Mix1 did not induce any oxidative stress in our cellular model, but prevent the H₂O₂-induced over activation of Nrf2 and NF-κB.

These effects were observed with the Mix1 containing 0.1 or 1 μM (in total content of ArOH), which is much lower than the needed content of individual compounds for same effects. Indeed, previous studies have demonstrated that Ole or Tyr can prevent ROS generation from 15 μM for Ole (27), 25 μM for *p*-Cou(18), or 50 μM for Tyr(17), in neuronal cells challenged with an oxidative stress inducer. Similarly, these compounds could prevent the NF-κB activation in a neuronal cells model, but at higher concentrations, from 10 to 50 μM (3, 18).

Moreover, for the first time we demonstrated that Ole, *p*-Cou and Tyr were internalized by SK-N-SH cells. Thus, these compounds could act as direct antioxidant through their $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 inhibition properties, but also by the regulation of intracellular redox factors. The *o*-quinones following ArOH oxidations are known as electrophilic molecules and play a role in cell signalling through protein-quinone interactions (28). Redox reactivity has been described between some oxidizable protein residues, and some quinone like compounds, e.g., quinone methide intermediates could inhibit the NF- κ B pathway and in the same time activate the translocation of Nrf2 and the induction of cytoprotective enzymes (29). Moreover, it seems that specific effects require a particular quinone-structure. For instance, Wu et al. have observed that the beneficial effects of Ole could be due to its OH-Tyr moiety, but other effects require the entire Ole molecule(30). Our cellular observations support the inhibition of NF- κ B overexpression, probably through quinone formation following ArOH oxidation, while the decrease of Nrf2 translocation could be explained by the decrease of ROS production following Mix1 treatment. It was previously suggested that a part of Ole is converted into OH-Tyr in rat brain following an *in vivo* administration (31). We can thus speculate that in our conditions, some biological effect of Ole corresponds to the combined effects of Ole and OH-Tyr. Moreover, the phenoxyl radical formed by the oxidation of *monophenolic* Tyr and *p*-Cou could undergo water addition in an aqueous media, as in a cellular system, leading to the formation of the corresponding *o*-quinone (Fig.S2) (25). This oxidation mechanism should be considered in studies investigating *monophenolic* ArOH properties in a cellular oxidative context, as they could act as proelectrophilic compounds.

Conclusion

In a biological system subject to oxidative conditions, ROS become the main electron acceptors. The electron transfer rate is dependent on the oxidation of the ArOH, which is associated to quinone form and others reactive intermediates which may regulate the activities of Nf- κ B or Nrf2. Quinones and intermediaries metabolites could also be implicated in the observed toxicity of the Mix1 at higher doses. This ArOH paradox are often pointed out (28) and suggests that their healthful effects are based on a delicate redox equilibrium.

In vivo, the redox balance is complex and not fully understood yet, but the unbalance is highly associated to neurodegenerative disorders and their cellular hallmarks. That is why combinatory approach to counteract oxidative injuries through synergism have already

been suggested (32, 33), notably to be active on various pathological targets. Our results demonstrate that for the first time an intracellular synergistic effect of Ole, Tyr and *p*-Cou, at low concentrations in equimolar proportion, to protect a neuronal cells towards oxidative stress injuries. We demonstrated that this ArOH combination modify their reactivity towards intracellular ROS and improve the neuronal redox balance. Our results support the relevance to combine some specific ArOH-EVOO in order to improve their beneficial effects with the aim to prevent or delay neuronal death involved in AD and PD progression.

Acknowledgements : this work was supported by Chaire Louise & André Charron on Alzheimer's disease, Institute of nutrition and functional food (INAF), NSERC, FQRNT, Fondation Armand-Frappier, Region Bretagne (ARED grant, LICHALZH N° 8964). We are very grateful to Sophie Tomasi for reading and discussion and to Solenn Ferron and Aurelie Sauvager for their technical assistance.

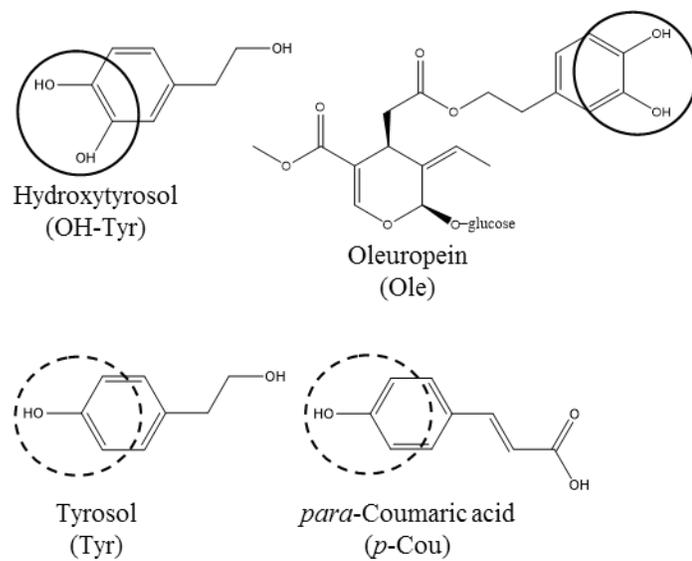


Figure 1. Chemical structures of ArOH-EVOO: (---) Catechol, (◻) monophenol.

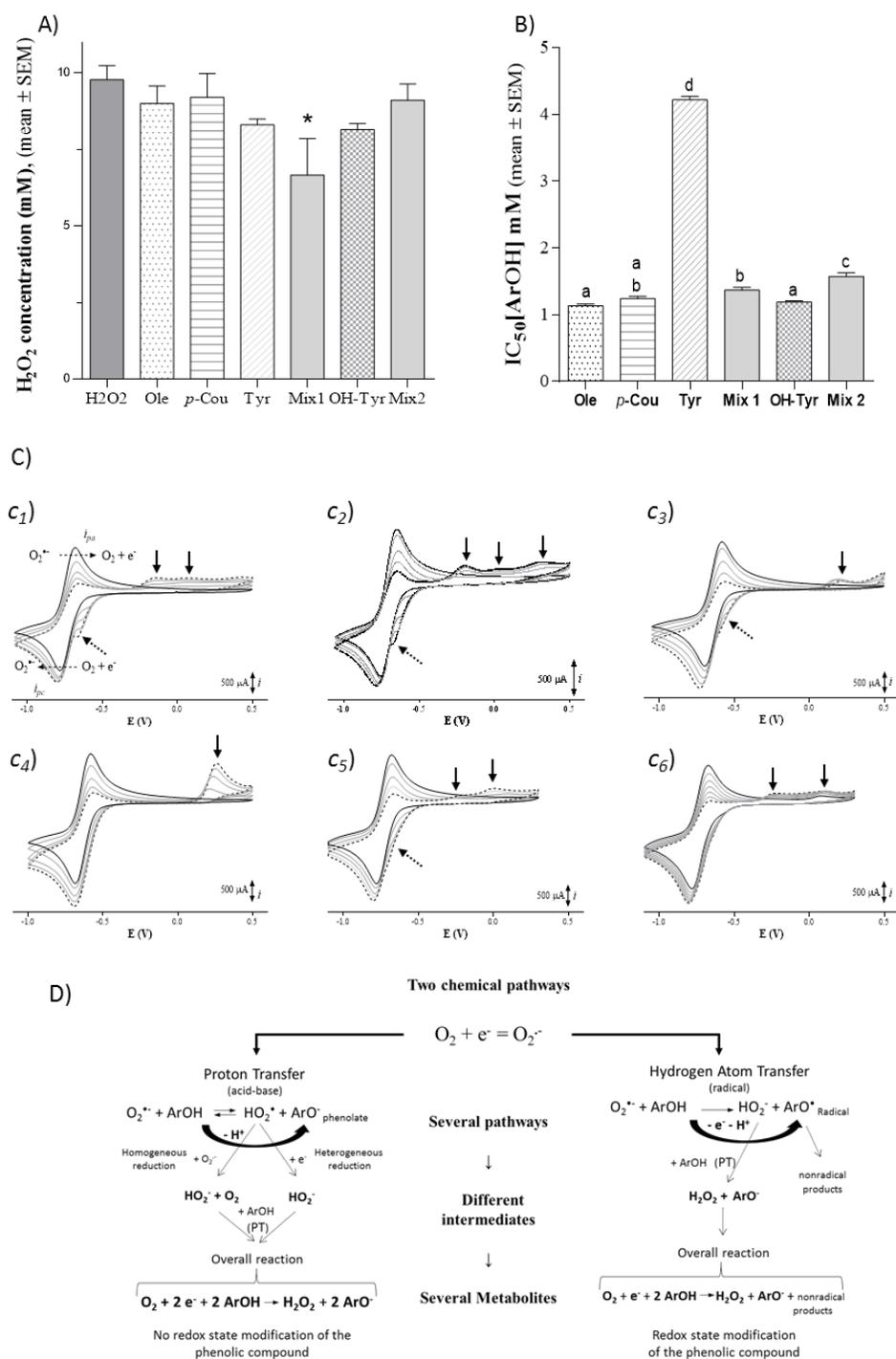


Figure 2. A) ArOH-H₂O₂ inhibition capacities. Initial H₂O₂ concentration was 10mM in PBS 0.1 M, pH 7.4. The inhibition capacity was evaluated using an ArOH/H₂O₂ ratio of 1/200. H₂O₂ concentration was measured by a calibration curve from the current intensity following the addition of H₂O₂ in the media. **p* < 0.05, as compared to the initial concentration of H₂O₂ using Tukey's statistical comparisons. B) ArOH-EVOO reactivity towards the superoxide radical anion O₂^{•-} ranked following their IC₅₀. IC₅₀ for each compound was measured by CV and calculated from the reactivity towards O₂^{•-}. Different letters indicate a statistically significant difference (**p* < 0.05) obtained from Tukey's statistical comparisons. C) CVs of O₂ ([O₂] = 0.94 mM) in the presence of increasing contents of (c1) Ole; (c2) OH-Tyr; (c3) *p*-Cou; (c4) Tyr; (c5) Mix 1; (c6) Mix2 at a GCE in DMF/0.1 M Bu₄NPF₆

, scan rate 0.1 V.s⁻¹. Potential were given vs. Ag/LiCl. Black curves: CV of O₂ without ArOH. Grey curves: the CV of O₂ with increasing contents of ArOH. The dot lines curves: CV of O₂ with ArOH at the latest concentration in the linear range: Ole =1.07 mM; OH-Tyr = 1.21 mM; *p*-Cou =1.20 mM; Tyr =7.34 mM; Mix1 =1.48 mM; Mix2 = 2.01 mM. **D) Reactivity mechanisms of ArOH towards O₂^{•-}**. ArOH reactivity could pass through mainly two chemical pathways: a Proton Transfer (PT) or a Hydrogen Atom Transfer (HAT). Adapted from (22).

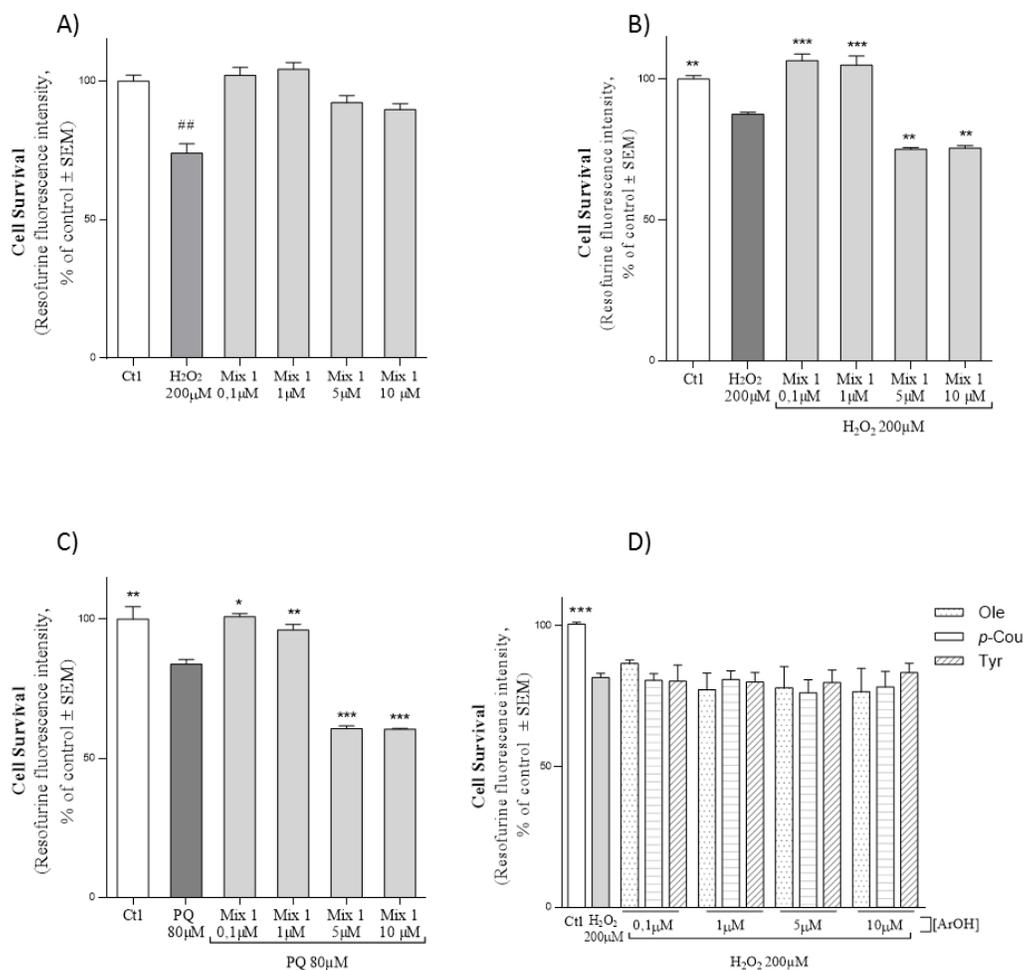


Figure 3. A) Effect of the Mix1 on SK-N-SH cell survival. B) Protective effect of the Mix1 against H₂O₂-induced toxicity. C) Protective effect of the Mix1 against PQ-induced toxicity. C) Neuroprotective abilities of individual ArOH : SK-N-SH cells were treated with H₂O₂ and/or the Mix1 or individual compounds. After 24 h of ArOH treatment or ArOH/ H₂O₂ co-treatments, cell viability were evaluated. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared to H₂O₂-treated cells and ## $p < 0.01$ compared to controls cells (Ctl), using Dunnett's-t test.

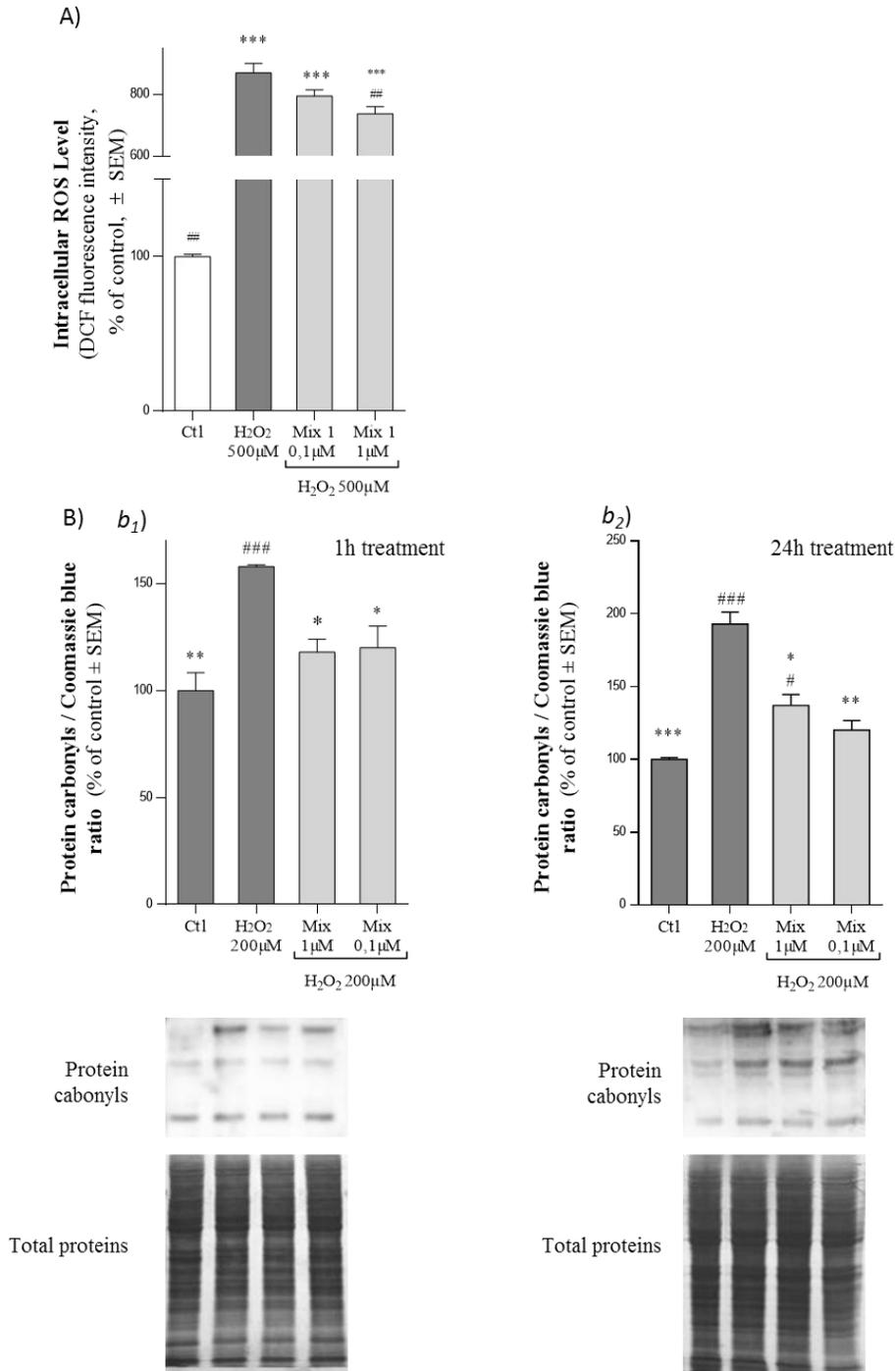


Figure 4. Effects of the Mix1 on H₂O₂-induced intracellular oxidative stress on SK-N-SH cell line. **A)** Effect on intracellular ROS levels after 1h of indicated treatments. **B)** Effect on intracellular protein carbonyls level after 1h (b₁) or 24 h of treatments (b₂). ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ as compared to non-treated cells, * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ as compared to H₂O₂-treated cells, using Dunnett's-t test.

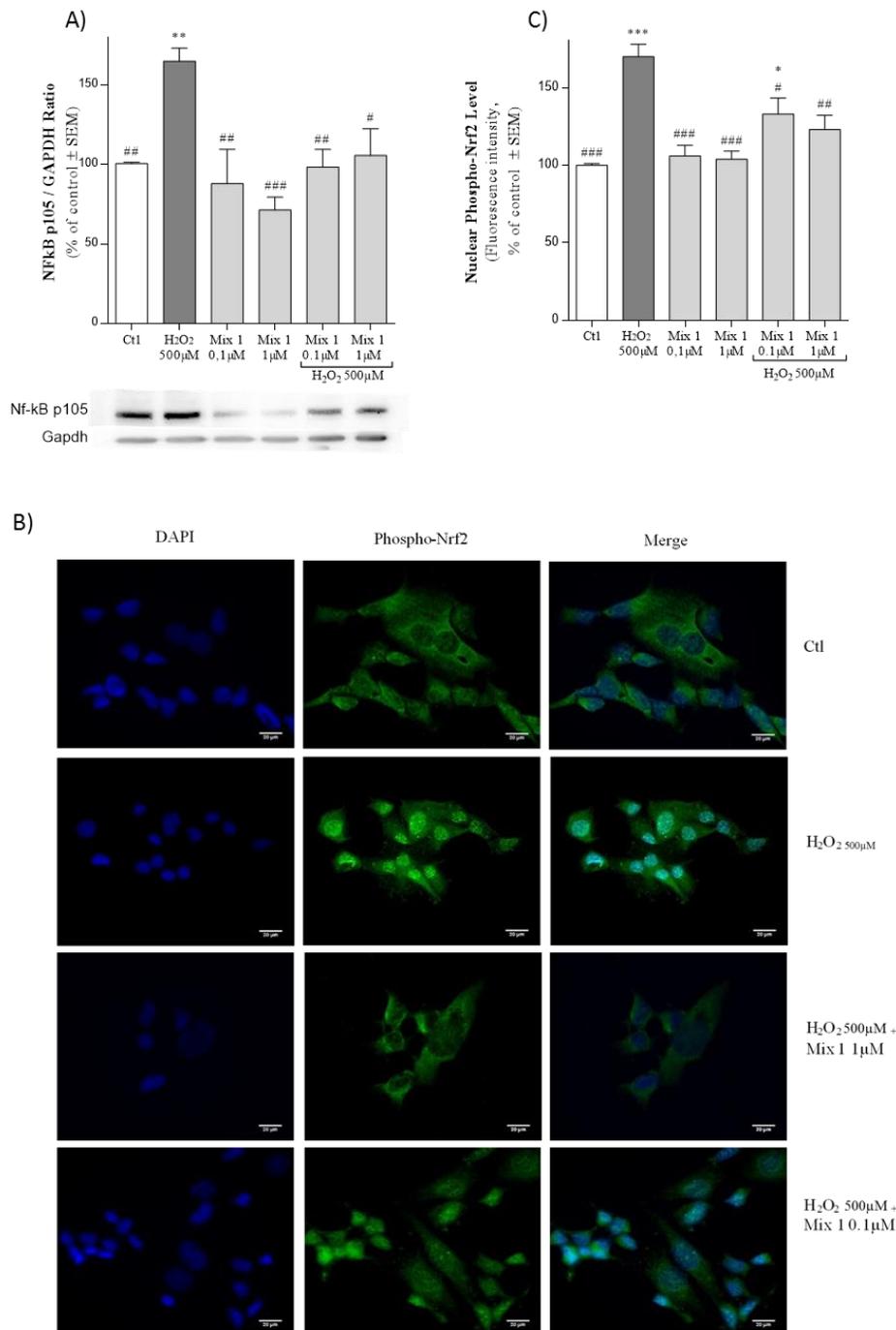


Figure 5. Effects of the Mix1 on the activity of the redox transcription factors. A) Activity of NF-κB through the subunit p105: SK-N-SH cells were co-treated with H₂O₂ and the Mix1 during 40 min. **B) Effect on nuclear phospho-Nrf2:** SK-N-SH cells were co-treated with H₂O₂ and the Mix1 during 60 min. **C) Quantitative fluorescence intensity measurement of the overlapped green (Alexa Fluor® 488 for phospho-Nrf2) with the blue (DAPI staining) fluorescence.** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to H₂O₂-treated cells using Dunnett's-t test.

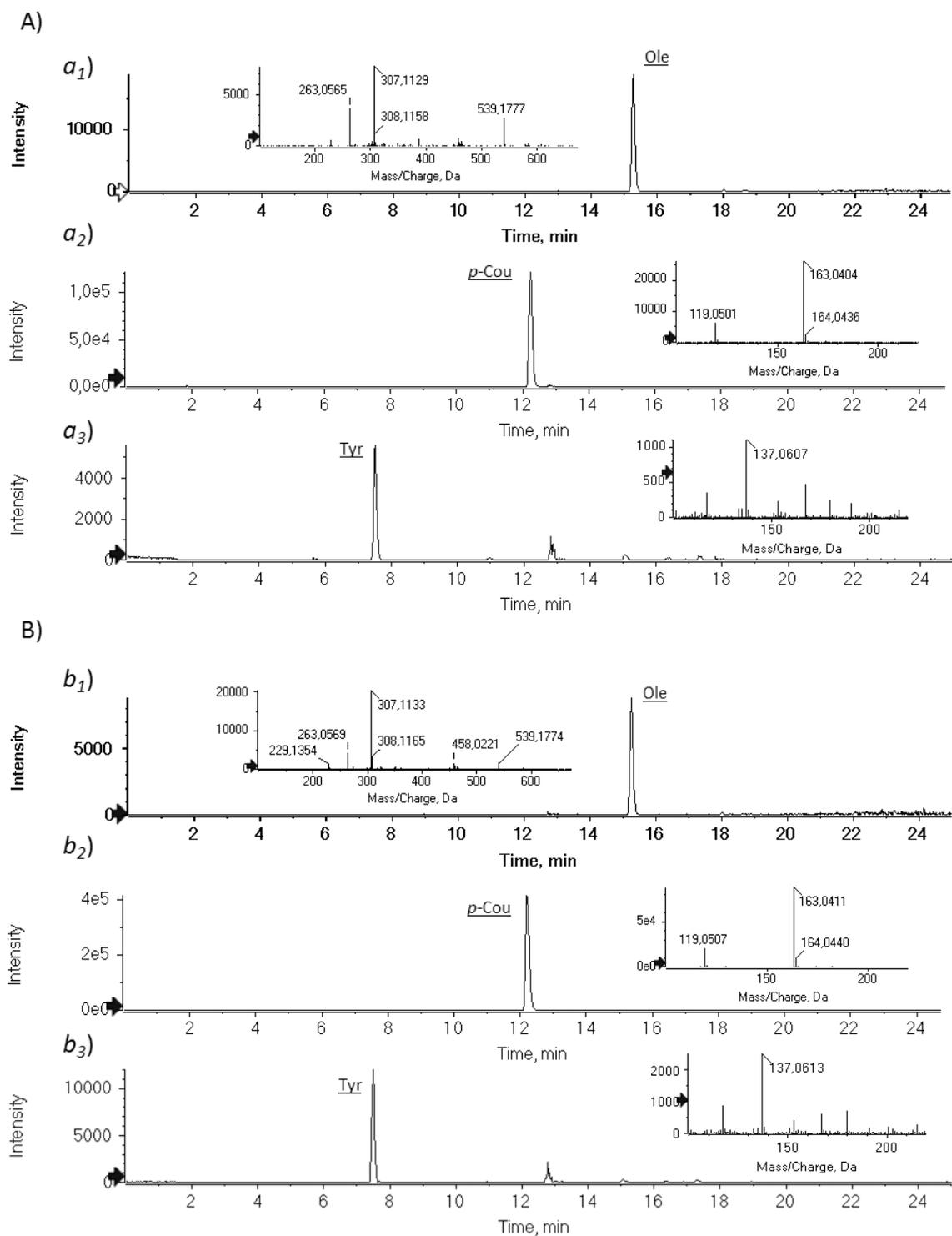


Figure 6. Extracted ion chromatograms of ArOH and corresponding MS spectra from SK-N-SH extracts after A) 30 min of treatment with the Mix 1 1 μM; B) 30 min of co-treatment with the Mix 1 1 μM and H₂O₂ 200 μM: a1-b1), Ole XIC [M-H] - *m/z* 539.177; a2-b2) *p*-Cou XIC [M-H] - *m/z* 163.040; a3-b3), Tyr XIC [M-H] - *m/z* 137.0601.

Supplementary data

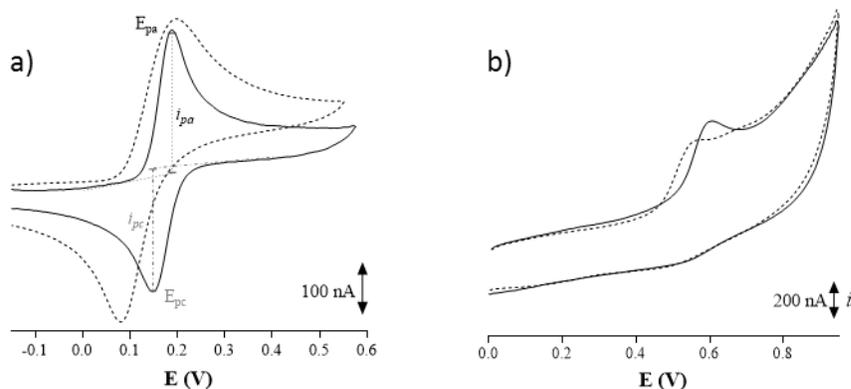


Fig. S1 : Voltammetry of phenolic compounds in aqueous media.

Cyclic voltammetry (CV) of ArOH (50 μ M). CV of ArOH were analyzed at GCE in phosphate buffer 0.1M , pH 7.4, nitrogen saturated during 10 min, KCl 0.5M as electrolyte, vs. Ag/AgCl reference electrode. Scan rate was 0.03V.s⁻¹. a) CV of (—) Ole and (- - -) OH-Tyr; these CV were background-subtracted in order to improve the visualization. b) CV of (- - -) p-Cou and (—) Tyr. E_{pa} and E_{pc} are relative to anodic and cathodic potential, respectively. i_{pa} and i_{pc} are relative to anodic and cathodic current intensity, respectively.

	<i>CV in aqueous media</i>			
	E_{pa}^1 (V)	E_{pc}^1 (V)	ΔE_p (V)	i_{pc}/i_{pa}
Ole	0.19	0.12	0.07	0.83
OH-Tyr	0.20	0.08	0.11	0.91
<i>p</i>-Cou	0.56	-	-	-
Tyr	0.60	-	-	-
Trolox	0.20	-	-	-
Ascorbic. Acid.	0.41	-	-	-

Table S1: CV data of ArOH (50 μ M) and standard antioxidants (1mM). E_{pa}^1 : first oxidation peak potential; E_{pc}^1 : reduction peak potential on the reverse scan.

Redox properties of olive oil phenolic compounds:

The electron transfer properties of these molecules were investigated in PBS. The CVs of Ole and OH-Tyr display a quasi-reversible system ($\Delta E_p = 70$ and 110 mV, respectively, i_{pc}/i_{pa} closed to 1, Table S1 and Fig.S1a). The anodic peak (E_{pa}) is attributed to the oxidation of the *ortho*-substituted catechol function to their *ortho*-quinonic form and back to the catechol form on the reverse cathodic scan (E_{pc}) (Fig.S1a). Moreover, Ole and OH-Tyr oxidize at a lower potential than ascorbic acid by 200mV which suggests that they are stronger reducing agents (Table S1). As previously reported (s1, s2), the two monophenols Tyr and *p*-Cou display an irreversible anodic peak on their CV at a +400mV higher than catechols (Fig. S1b)(27), corresponding to the formation of the phenoxy radical following the one electron-transfer oxidation of the hydroxyl group. *p*-Cou is easier to oxidize than Tyr, by 40mV due to conjugative effects of the $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ substituent (31). The CVs of the Mix1 and Mix2 did not reveal any additional peaks as compared with the individual anodic peaks of each compound (data not shown).

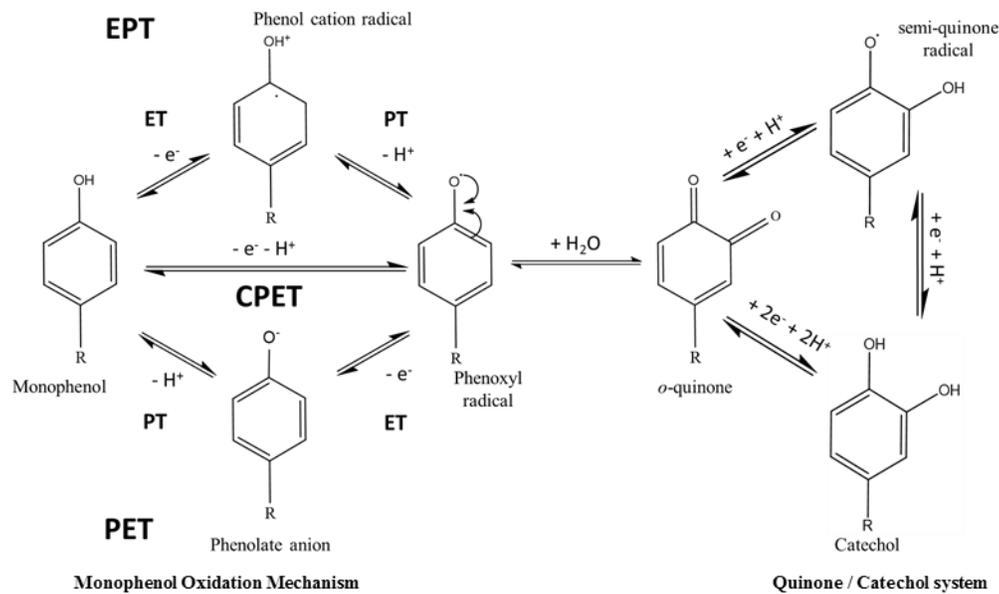


Fig. S2. *para*-substituted monophenol and quinone/catechol electron transfer mechanisms adapted from (s3-s5). *para*-monophenol oxidation involves a phenoxyl radical formation through the transfer of one electron and one proton according to three possible mechanisms: a PET (proton electron transfer), an EPT (electron proton transfer) or a CPET (coupled proton electron transfer), depending on the pH, the media and the pKa (s6). In aqueous media the phenoxyl radical undergoes reaction which results in the formation of an *o*-quinone (s3).

Supplementary references:

1. Paradiso VM, Di Mattia C, Giarnetti M, Chiarini M, Andrich L, Caponio F. Antioxidant Behavior of Olive Phenolics in Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem*. 2016;64(29):5877-86. 1.
2. Janeiro P, Novak I, Seruga M, Maria Oliveira-Brett A. Electroanalytical Oxidation of *p*-Coumaric Acid. *Analytical Letters*. 2007;40(17):3309-21.
3. Enache TA, Oliveira-Brett AM. Phenol and *para*-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011;655(1):9-16.
4. Nematollahia D, Rafieeb M, Fotouhic L. Mechanistic Study of Homogeneous Reactions Coupled with Electrochemical Oxidation of Catechols. *J Iran Chem Soc*. 2009;6:448-76.
5. Kovacic P. Unifying mechanism for addiction and toxicity of abused drugs with application to dopamine and glutamate mediators: electron transfer and reactive oxygen species. *Med Hypotheses*. 2005;65(1):90-6.
6. Costentin C, Louault C, Robert M, Savéant JM. Evidence for Concerted Proton-Electron Transfer in the Electrochemical Oxidation of Phenols with Water As Proton Acceptor. *Tri-tert-butylphenol*. *J Am Chem Soc*. 2008;130:15817-9.

References

1. Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart É, Fulop T, et al. Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;130:499-511.
2. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *International journal of molecular medicine*. 2018;41(4):1817-25.
3. St-Laurent-Thibault C, Arseneault M, Longpre F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling. *Current Alzheimer research*. 2011;8(5):543-51.
4. Valls-Pedret C, Sala-Vila A, Serra-Mir M, Corella D, de la Torre R, Martinez-Gonzalez MA, et al. Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2015;175(7):1094-103.
5. Alcalay RN, Gu Y, Mejia-Santana H, Cote L, Marder KS, Scarmeas N. The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2012;27(6):771-4.
6. Tasioula-Margari M, Tsabolatidou E. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants (Basel)*. 2015;4(3):548-62.
7. Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A, J.A. DR. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves. *Food chemistry*. 2000;68:457-62.
8. Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME, Berset C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. *JAOCS*. 2003;80(10):1007-12.
9. Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Del Carlo M, Gallina-Toschi T, et al. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(23):8918-25.
10. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Biomol Chem*. 2005;3(3):423-30.
11. Hotta H, Nagano S, Ueda M, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572(1):123-32.
12. De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, Reyes JJ, Benitez-Guerrero A, Espartero JL, et al. Differences in the Neuroprotective Effect of Orally Administered Virgin Olive Oil (*Olea europaea*) Polyphenols Tyrosol and Hydroxytyrosol in Rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(25):5957-63.
13. Belkacemi A, Ramassamy C. Innovative Anthocyanin/Anthocyanidin Formulation Protects SK-N-SH Cells Against the Amyloid-beta Peptide-Induced Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2015;16(1):37-49.

14. Khalatbary AR. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutritional neuroscience*. 2013;16(6):243-9.
15. López de las Hazas M-C, Godinho-Pereira J, Macià A, Almeida AF, Ventura MR, Motilva M-J, et al. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. *Journal of Functional Foods*. 2018;46:110-7.
16. Kim MH, Min JS, Lee JY, Chae U, Yang EJ, Song KS, et al. Oleuropein isolated from *Fraxinus rhynchophylla* inhibits glutamate-induced neuronal cell death by attenuating mitochondrial dysfunction. *Nutritional neuroscience*. 2018;21(7):520-8.
17. Dewapriya P, Himaya SW, Li YX, Kim SK. Tyrosol exerts a protective effect against dopaminergic neuronal cell death in in vitro model of Parkinson's disease. *Food chemistry*. 2013;141(2):1147-57.
18. Yoon JH, Youn K, Ho CT, Karwe MV, Jeong WS, Jun M. p-Coumaric acid and ursolic acid from *Corni fructus* attenuated beta-amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF-kappaB signaling pathway in PC12 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(21):4911-6.
19. Alirezaei M, Rezaei M, Hajjighahramani S, Sookhtehzari A, Kiani K. Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats. *J Physiol Sci*. 2017;67(1):131-9.
20. Sakamula R, Thong-asa W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. *Metabolic Brain Disease*. 2018.
21. Lohezic-Le Devehat F, Tomasi S, Elix JA, Bernard A, Rouaud I, Uriac P, et al. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *Journal of Natural Products*. 2007;70:1218–20.
22. Rene A, Abasq ML, Hauchard D, Hapiot P. How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Analytical chemistry*. 2010;82(20):8703-10.
23. Le Bourvellec C, Hauchard D, Darchen A, Burgot JL, Abasq ML. Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*. 2008;75(4):1098-103.
24. Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, et al. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(1):81-92.
25. Enache TA, Oliveira-Brett AM. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011;655(1):9-16.
26. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56.
27. Pasban-Aliabadi H, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M, Mehdizadeh A, Yaghoobi MM. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. *Rejuvenation research*. 2013;16(2):134-42.
28. Bolton JL, Dunlap T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. *Chemical Research in Toxicology*. 2017;30(1):13-37.

29. Pierce EN, Piyankarage SC, Dunlap T, Litosh V, Siklos MI, Wang YT, et al. Prodrugs Bioactivated to Quinones Target NF-kappaB and Multiple Protein Networks: Identification of the Quinonome. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(7):1151-9.
30. Wu L, Velander P, Liu D, Xu B. Olive Component Oleuropein Promotes β -Cell Insulin Secretion and Protects β -Cells from Amylin Amyloid-Induced Cytotoxicity. *Biochemistry*. 2017;56(38):5035-9.
31. Serra A, Rubio L, Borrás X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(3):486-96.
32. Pratico D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:70-8.
33. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv*. 2016.

CHAPITRE 3

:

UV-VIS SPECTROELECTROCHEMISTRY OF OLEUROPEIN, TYROSOL AND *p*-COUMARIC ACID INDIVIDUALLY AND IN AN EQUIMOLAR COMBINATION. DIFFERENCES IN LC-ESI-MS² PROFILES OF OXIDATION PRODUCTS AND IN THEIR NEUROPROTECTIVE PROPERTIES.

Statut de l'article : Soumis dans le journal *Journal of Agricultural and food chemistry* (le 09 mai 2019).

Auteurs de l'article : Morgane LAMBERT DE MALEZIEU^{a,b,c}, Solenn FERRON^a, Aurélie SAUVAGER^a, Patricia COURTEL^a, Charles RAMASSAMY^{b,c}, Sophie TOMASI^{a*}, Marie-Laurence ABASQ^{a*}

^a Univ Rennes, CNRS, ISCR – UMR 6226, F-35000 Rennes, France

^b INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada.

^c INAF, Quebec, QC, Canada.

I. Résumé et objectifs de l'article 2 :

Les composés phénoliques majoritaires de l'huile d'olive comme l'oleuropéine ou le tyrosol, et l'acide *p*-coumarique sont reconnus, possédant plusieurs propriétés biologiques, et notamment des propriétés antioxydantes et une capacité neuroprotectrice. Cependant, les connaissances portant sur leurs réactivités lorsqu'ils sont combinés entre eux sont limitées. Dans nos précédents travaux, nous avons observé une potentialisation de la somme de leurs effets antioxydants *in vitro* et *in cellulo*. Nous nous sommes donc intéressés de façon plus approfondie à leur comportement et à leurs évolutions structurales en conditions oxydatives. Individuellement ou en combinaison équimolaire, les composés phénoliques ont été soumis à une oxydation électrochimique et qui a été suivie par un spectrophotomètre. De plus, une oxydation dite séquentielle a été réalisée

afin de déterminer si la génération de composés spécifiques dépendait de l'oxydation simultanée de l'oleuropéine, du tyrosol ou de l'acide *p*-coumarique.

La comparaison des profils LC-ESI-MS² des solutions oxydées et des solutions natives a permis de mettre en évidence des composés spécifiquement générés lors de l'oxydation des trois composés phénoliques combinés. Nous avons émis l'hypothèse que ces composés étaient issus d'un couplage des formes natives et oxydées de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique ou du tyrosol. La régénération de l'oleuropéine dans le Mix soumis à l'oxydation est potentiellement due à des réactions rédox couplées à travers la réactivité de sa forme quinone.

Cette étude a aussi montré une capacité neuroprotectrice significative de la solution de Mix oxydé et de l'oleuropéine oxydée pour diminuer la toxicité induite par le H₂O₂ sur les cellules neuronales SK-N-SH. Cette activité observée à de faibles concentrations (1 et 5 nM) présume de l'effet biologique concret des produits issus de l'oxydation des composés phénoliques, et plus particulièrement ceux issus de l'oleuropéine pour limiter la mort des cellules neuronales soumises à un stress oxydatif.

II. Contribution de l'étudiant à l'article 2 :

L'article a été soumis dans *Phytochemistry*, un journal consacré à l'étude de la physico-chimie des composés phytochimiques et à leurs impacts potentiels dans le domaine de la biologie.

Dans ce travail, j'ai réalisé l'étude des propriétés rédox des composés phénoliques avec l'expertise de Marie-Laurence Abasq pour l'interprétation, qui a proposé un schéma expérimental spectroélectrochimie UV-Vis/LC-MS² d'analyse des produits d'oxydation individuellement et en mélange (électrolyse simultanée ou séquentielle). À l'aide de Patricia Courtel, nous avons observé leurs évolutions spectroscopiques issues de leur oxydation. Les électrolyses des composés phénoliques ont principalement été réalisées par Patricia Courtel et Solenn Ferron. Avec l'aide d'Aurélie Sauvager nous avons tenté la mise au point de l'analyse LC-MS des solutions oxydées, avant de faire appel à un appareillage externe au laboratoire. J'ai analysé les données LC-MS² avec l'aide et l'expertise de Solenn Ferron, Aurélie Sauvager et Sophie Tomasi. Enfin, j'ai proposé les modifications structurales des composés phénoliques oxydés qui ont été validées ou modifiées par Sophie Tomasi. Ces différents travaux ont été réalisés à l'université de

Rennes 1 en France. J'ai réalisé l'étude de neuroprotection à l'INRS Centre Armand-Frappier, au Québec.

De plus, l'interprétation des résultats a été réalisée conjointement par moi-même, Marie-Laurence Abasq, Sophie Tomasi, Solenn Ferron et Arurélie Sauvager. L'écriture en langue anglaise de l'article a été répartie entre moi-même, Marie-Laurence Abasq et Sophie Tomasi. Enfin, Charles Ramassamy a effectué une relecture finale.

III. Article 2

Abstract

Major phenolic compounds from olive oil (ArOH-EVOO), oleuropein (Ole), tyrosol (Tyr) and *p*-coumaric acid (*p*-Cou), are known for their antioxidant and neuroprotective properties. We previously demonstrated that their combination could potentiate their antioxidant activity *in vitro* and *in cellulo*. To further our knowledge of their electron-transfer properties, Ole, Tyr and *p*-Cou underwent a spectroelectrochemical oxidation study down either individually or in equimolar mixtures. Two mixtures (Mix and Mix-seq) were prepared in order to determine whether distinct molecules could arise from their simultaneous or sequential oxidation. The comparison of LC-ESI-MS² profiles of each ArOH-EVOO, in native forms or after oxidation, highlighted the presence of specific oxidized products found in the mixes. We hypothesized that they derived from the hetero-dimerization between Ole, Tyr or *p*-Cou, which have reacted either in native or in oxidized forms. Ole regenerates when the Mix undergoes oxidation. Hence, its quinone potentially reacted with coupled redox reactions. Our study also showed a significant neuroprotection by oxidized Ole and oxidized Mix against H₂O₂ toxicity on SK-N-SH cells, after 24h of treatment with very low concentrations (1 and 5 nM). This suggests the putative relevant role of oxidized Ole products to protect or delay neuronal death.

Keywords: *Olive oil phenolic compounds – UV-vis spectroelectrochemistry – LC/MS² – Oxidation – Electron transfer - Neuroprotection*

Introduction

Phenolic compounds from olive oil (ArOH-EVOO) are studied for their antioxidant and neuroprotective properties. Indeed, the *ortho*-diphenol oleuropein (Ole) and its derivative hydroxytyrosol (OH-Tyr) have shown some interesting reactivities in non-cellular *in vitro* assays, such as DPPH, superoxide radical, peroxy radical inhibition methods and reducing capacity methods^{1 2 3} (Figure 1). The chemistry behind these assays involves H-atom transfer (HAT), radical-chain breaking and electron transfer (ET) mechanisms which have been reported by Apak.⁴ The monophenols, tyrosol (Tyr) and *p*-coumaric acid (*p*-Cou), are weaker H-atom and electron donors, even though *p*-Cou could reveal superoxide scavenging capacity almost as high as Ole and OH-Tyr ascribed to its higher conjugative effects.^{5,6,7,8,9} In these non-cellular assays, the reactivity of the ArOH-EVOO engages among others the formation of oxidized species, which have been partially analyzed so far by NMR or HPLC-MS. Scarce molecules have been fully identified as quinones, dimers, trimers, aldehydes or acids.^{10,11,12,13,14,15,16} Moreover, ArOH-EVOO can act on cell signaling pathways and have also shown some antioxidant effects in cellular models by activation or inhibition of redox factors when for example neuronal cells are exposed to chemical stressors.^{17,18,19,20} The biochemistry behind the activation is not fully understood and could also release oxidized molecules. A major highlight is that some molecule combinations enhance the antioxidant efficacy in both non-cellular and cellular *in vitro* assays by synergic effects.^{21,1,22,23} Indeed, our previous work has shown for instance that a low concentration equimolar mix of Ole, Tyr and *p*-Cou (0.1 and 1 μ M) reduces intracellular ROS and protein carbonyl levels, and prevents the activation of Nrf2 and NF- κ B in neuronal SK-N-SH cells challenged with H₂O₂ or Paraquat, which is much lower than the required concentration of individual molecule to observe similar effects.⁹ In non-cellular assays dedicated to evaluate superoxide or hydrogen peroxide inhibition, a significant difference in reactivity of Mixes was also observed. Indeed the presence of Ole in combination with the two monophenols (Tyr, *p*-Cou) displayed higher reactivity than when OH-Tyr was present.⁹ This activity was attributed to possible coupled redox and/or intermolecular reactions occurring in the Mix containing Ole, generating stronger H-atom or electron donor compounds when the Mix is subjected to oxidation. An interesting approach to explore this assumption is to electrochemically oxidize the three molecules simultaneously or sequentially, and to analyze with LC-ESI-MS² whether new molecules emerge from the combination. *In vivo*, ArOH-EVOO are well-absorbed and tolerated and have been shown to increase the antioxidant capacity of plasma.^{24,25} For instance, Ole enhances the expression of antioxidant enzymes and reduces inflammatory markers.^{26,27,28} Except for *p*-Cou which was recovered into its free form in plasma²⁹, ArOH-EVOO are recovered

as glucuronidated, sulfated or methylated forms in plasma and urine.^{30,31,32} So far, glucuronidated or sulfated ArOH-EVOO metabolites are looked for in *in vivo* and *ex vivo* studies, which does not exclude the presence of other types of metabolites issued from a redox pathway as it was demonstrated by Fasi et al.³³ Indeed, their LC-MS and NMR data are available and well-documented. As quinone precursors, phenolic compounds are also described as pro-electrophilic drugs to activate the Nrf2/ARE pathway.^{34,35} Moreover, it has been suggested that oxidation products of Tyr, presenting few *in vitro* antioxidant capacities under its native form, could be responsible for its cellular effect in neuronal cells, notably to explain the inhibition of NF- κ B activation.¹⁷

In this study, the objective was twofold. A spectroelectrochemical technique was used to access stable oxidized molecules of ArOH-EVOO (Ole, Tyr and *p*-Cou) (Figure 1), studied singly or in combination. This helped update the liquid chromatography –tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS²) database which will be helpful to understand the cell signaling pathways. Moreover, we focused on the differences in LC-ESI-MS² profiles of oxidation products between all samples studied. Neuroprotective effects of some oxidized samples were evaluated to thwart H₂O₂ induced neuronal death.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents. Commercially available chemicals were used without any further purification. Tyrosol, *para*-coumaric acid, oleuropein were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 0.1M was purchased from Lonza (Switzerland). MilliQ water was used for all the experiments. Oleuropein, tyrosol and *para*-coumaric acid were dissolved in DMSO (final concentrations do not exceed 5% DMSO for electrochemical assays), then diluted in PBS to obtain the adequate concentrations for square wave voltammetry SWV and electrolysis procedures. A blend of Ole, Tyr and *p*-Cou was prepared in equimolar proportion called herein Mix. A sequential mixture, coded Mix-seq, was also prepared and electrolyzed following the procedure described below (see 4.2.2).

Electrochemical procedures

Square wave voltammetry SWV of Phenolic compounds. SWV experiments were carried out on a dual potentiostat-galvanostat PGSTAT100 (Autolab instrument, Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands). Measurements were performed with a three-electrode thermostated cell. A glassy carbon disk working electrode (\varnothing 2 mm), a platinum wire counter electrode and a reference electrode, Ag/AgCl/KCl 3 M were used. Before each measurement, the glassy carbon disk working electrode was polished on a waterproof Silicon Carbide Paper 4000 (Struers) using a

0.3 μ m alumina suspension, washed with distilled water and dried. For the second SWV scan, the electrode surface was not polished in order to investigate if new peaks would emerge which would mean the formation of new compounds in the diffusion layer following the first scan. The temperature was maintained at 20 ± 0.02 °C with a Julabo heating circulator MP-5 (Julabo, Seelbach, Germany). Before each measurement, a 25 μ M ArOH solution was freshly prepared in phosphate buffer pH 7.4 0.1M and nitrogen saturated during 10 min. The SWV were recorded at scan rate 0.05V.s⁻¹. E_{pa} and E_{pc} are relative to anodic and cathodic potential, respectively. i , i_r , i_f , i_b are relative to current intensity, total current; forward current, backward current, respectively.

Spectroelectrochemical measurements. Spectroelectrochemical studies were conducted using a combined potentiostat/ galvanostat (AUTOLAB PGSTAT 204, Metrohm, Switzerland) and spectrometer (Avantes, AvaSpec-ULS20 48) equipped with a UV-Visible deuterium/ halogen light source (200 – 2500 nm). This system was controlled by NOVA 1.10 software. The three-electrode cell was used comprising a platinum grid working electrode (7 x 6 mm, wire diameter 0.3 mm), a platinum wire counter electrode and an Ag/ AgCl/ KCl 3M reference electrode placed in the optical path (1mm) of a spectrophotometric quartz cuvette. All potentials reported herein are vs. Ag/ AgCl reference electrode. Before each measurement, the platinum grid working electrode was washed with H₂SO₄ 0.2 M and sonicated during 5 minutes. Then, a cleaning was done by recording 200 cyclic voltammograms in H₂SO₄ 0.2 M between - 0.5 V and + 1.5 V (scan rate 0.5 V.s⁻¹). In a second step, the platinum grid was cleaned recording 200 cyclic voltammograms in phosphate buffer pH 7.4 between -1.2 and + 1.5 V (scan rate 0.5 V.s⁻¹). Before all measurements, a 2 mM ArOH solution was freshly prepared in phosphate buffer pH 7.4 0.1M and nitrogen saturated during 15 min at room temperature. For Mix and Mix-seq, the total phenolic concentration in equimolar ratio of each compound was 2 mM. For each sample, an aliquot was immediately argon saturated and stored at -20°C (reference sample) and an aliquot of 600 μ l was collected for the amperometry experiment. After electrolysis, the whole electrolyzed solution was collected, argon saturated in a sealed vial and stored at -20°C.

Linear sweep voltammetry. The LSV ($i = f(E)$) were firstly recorded at a scan rate of 0.005 V.s⁻¹ in order to determine the anodic potential E_{pa} of the phenolic and Mixes samples (Table 5). UV-Vis spectra were simultaneously recorded between 200 and 600 nm (Figure 3).

Electrolyses. Electrolyses were then performed by a chronoamperometry technique $i = f(t)$ at a fixed potential during 7200 seconds. The applied electrolysis potential was chosen at + 300 mV after the anodic potential E_{pa} measured by the LSV (Table 5). The UV-vis spectra were simultaneously recorded. During electrolysis, nitrogen bubbling was maintained, first to avoid any oxidation derived from oxygen and also to mix the solution in order to oxidize a maximum of

phenolic molecules (the whole cell volume is 600 µl, whereas the optic way compartment holds approximately 200 µl of the solution). After electrolysis, the solution was retrieved, saturated with argon in a sealed vial and stored at -20°C.

Electrolysis of Ole, Tyr and *p*-Cou individually. The potential was fixed at +0.7 V for the Ole electrolysis and +1 V for the Tyr and *p*-Cou electrolysis.

Simultaneous and sequential electrolysis of Ole, Tyr and *p*-Cou in combination. The potential was fixed at +0.9 V for the Mix electrolysis. For Mix-seq procedure, a 1:1 (v/v) blend of tyrosol and *p*-coumaric acid (each one of them 2 mM in PBS) was freshly prepared and electrolyzed at + 0.90V during 7200 seconds. Oleuropein (2 mM in PBS) was added in this electrolyzed sample to obtain a reference, which was stored at - 20°C under argon until LC-MS analysis. It was labelled as [(Tyr + *p*-Cou) Ox + Ole] Ref or as Mix-seq Ref. In a (Tyr, *p*-Cou) Ox sample, Ole was added and the electrolysis was prolonged during 7200 sec at + 0.7 V, then retrieved and stored. It was coded as Mix-seq Ox.

HPLC-DAD-ESI-MS² process. Reference and electrolyzed solutions, previously filtered on PTFE 0.45 µm filter (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were analyzed at 2mM of reference solution on a system equipped with a SCM1000 degasser (ThermoScientific, San Jose, CA, USA), a 1100 series binary high-pressure pump (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), and a Surveyor autosampler thermostated at 4°C (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Two detectors were connected in series: an UV-visible diode array detector (model UV6000 LP, ThermoFinnigan) and an Ion Trap Mass Spectrometer equipped with an electrospray ionization source (model LCQ Deca, ThermoFinnigan). The reversed-phase chromatography column used was a Purospher® STAR RP-18 endcapped (3µm) Hibar® HR (Merck, 2.1 x 150 mm) equipped with a precolumn Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, 2,1 x 12,5 mm, 5 µm). The analysis procedure was adapted from.³⁶ The oven was thermostated at 30°C. Two microliters of sample was injected for analysis. The solvent system was a gradient of A (0.1% formic acid in ultrapure water) and B (0.1% formic acid in acetonitrile), which were filtered on 0.45 µm GH Polypro membrane (VWR, Fontenay sous Bois, France), respectively, before being used. An elution gradient was applied as follows with a flow rate of 0.2 mL/min: initial, 3% B; 0–3 min, 7% B, linear; 3–21 min, 13% B, linear; 21-27 min, 13% B isocratic; 27-39 min, 38% B, linear; 39-47 min, 50% B, linear; 47-58 min, 90% B, linear; 58-61 min, 90% B; followed by washing and reconditioning the column. UV -visible detection covered the 240– 600 nm wavelength range. Peaks corresponding to Tyr, *p*-Cou and Ole were integrated at 275, 310 and 280 nm respectively. The whole effluent from the UV-Visible detector was injected in an ESI source. Source parameters were negative ion mode, spray voltage (4.2 kV), capillary voltage (-41 V), sheath

gas (66 arbitrary units), auxiliary gas (10 arbitrary units), and capillary temperature (250°C). The nebulizing gas was nitrogen, and the damping gas was helium. MS spectra were acquired in full scan, negative ionization mode in the m/z 50–2000 range. A MS² dependent-scan mode was also performed to obtain the product ion spectrum of the main molecular ions detected in full scan mode. For the MS² experiment, collision energy was selected arbitrarily as 35 eV. Data obtained were processed with 1.2 Xcalibur software (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

HPLC-DAD-ESI-MS² analysis. In order to identify the neoformed metabolites, the UV-Vis chromatogram and the MS spectrum of the electrolyzed solution were compared to their own reference. Particular attention was paid to wavelength maxima of the standard ArOH: 280 nm for OleTyr and OH-Tyr, and 320 for *p*-Cou. All experiment were carried out in triplicate. Native compounds were identified using their pure standards. Neoformed compounds following electrolysis were tentatively identified by combining their retention time, mass spectra and fragmentation, and UV-Vis absorption maxima described in the cited literature.

Cell culture and Cell viability assay. In order to determine if the oxidized phenolic compounds had neuroprotective capacities, 600 µl of Ole 10 µM or the Mix 10 µM were electrolyzed 2 times as previously described and pooled together (2 x 600 µl Oleuropein and 2 x 600 µl Mix). The electrolyzed solutions were then lyophilised before solubilisation in PBS, in order to obtain a stock solution at 10 µM relative to the concentration of native compounds. Then, adequate dilution were done in cell culture medium.

Cell viability assay. The human neuroblastome SK-N-SH cells were maintained in MEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 100 µg/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 1% sodium pyruvate (1mM) in a humidified incubator at 37°C with 95% O₂ and 5% CO₂. 24 h after seeding, cells were starved for 1 hour before any treatment. Cells were grown to 80% confluence and then plated at a density of 2E4 cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h at 37°C. Cell survival was assessed 24 hours after the treatments, using the Tox-8 (Resazurin-based) kit following the manufacturer's instructions. Measure were done on six well for three separated experiments and results were expressed as mean ± SEM. Data were statistical analyzed by ANOVA followed by the Dunnett's-t test. Differences were considered significant when *p*-values < 0.05. Analyses were performed using GraphPad Prism software.

RESULTS AND DISCUSSION

Two mixtures (Mix and Mix-seq) of three major phenolic compounds from olive oil (Ole, Tyr and *p*-Cou) were prepared in order to investigate whether specific interesting molecules could arise from their simultaneous or sequential oxidation *via* an electrochemical technique. Firstly, the

square wave voltammetry and the spectroelectrochemistry of the individual molecules were examined to access the individual data. Secondly, a 2 mM solution of phenolic standards and of the mixtures Mix and Mix-seq were analyzed, before and after electrolysis, by LC-UV-ESI-MS² in negative mode, in order to compare their metabolite profiling. The appearance of new peaks in electrolyzed samples compared to those in the not electrolyzed samples (i.e. reference) led to identify some specific oxidized products. The occurrence of some of these compounds in oxidized Ole, Tyr or *p*-Cou, thanks to other oxidation methods other than electrochemical procedure, was also discussed.

Square Wave Voltammetry (SWV) of the three ArOH-EVOO standards. The electron transfer properties of Ole, Tyr and *p*-Cou were investigated by SWV in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4. As expected, the SWV of Ole exhibited a quasi-reversible system whereas the SWVs of the two monophenols Tyr and *p*-Cou displayed an irreversible anodic peak (E_{pa}) at a higher potential which attests a lower electron-donating ability than Ole, respectively $E_{pa} = + 0.15, + 0.53, + 0.56$ V (Figure 2). As it is well-known, the *ortho*-diphenol function was oxidized in a two-electron-proton mechanism in its *ortho*-quinonic form on the anodic scan and was reversibly reduced back to the catechol form on the reverse cathodic scan^{37,38} (for detailed mechanisms for phenol oxidation see ³⁹). The Ole SWV second scan, without cleaning the electrode surface, did not display any additional peak attesting that the quinone was stable at the voltammetry time scale. The oxidation of monophenols is monoelectronic and gives rise to a transient phenoxyl radical^{37,40} (for a review on detailed mechanisms see⁴¹). The Tyr and *p*-Cou SWV second scan displayed an oxidation peak A_2 at a lower potential ($A_2 \text{ Tyr} = + 0.13\text{V}$; $A_2 \text{ p-Cou} = + 0.20\text{V}$), related to a reduction peak on the backward scan, C_2 , at approximately the same potential, which reveals a reversible system (Figure 2b,c). As explained by Enache and al, this A_2 - C_2 system is linked to the formation of a quinone compound by water addition on a phenoxyl radical.⁴⁰

Spectroelectrochemical analysis of three ArOH-EVOO standards individually and in the Mix samples. Controlled potential electrolysis of the ArOH-EVOO and of the mixtures (Mix and Mix-Seq) were achieved in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 in a modified UV cell at a platinum grid electrode. UV Spectra were firstly recorded during the linear sweep voltammetry LSV at different potential values. At +0.09V (Figure 3a₁), Ole remained under its native form and the wavelengths of maximum absorption λ_{max} were measured at 250 and 280 nm (Figure 3b₁). At + 0.33 and + 0.56V, Ole was under its quinone form and an absorption band was visible at 400 nm, attesting the oxidation of the molecule. The *in situ* UV-Vis spectra during LSV of Tyr and *p*-Cou did not show any significant differences between before and after oxidation, nevertheless a more pronounced hypochromic effect was noticed for *p*-Cou at 300 nm (Figure 3a-b_{2,3}). None

transient compounds were detected here. The Ole electrolysis of Ole was conducted at + 0.7 V during 7200 seconds (Figure 3c₁). The UV spectrum of the final solution showed λ_{\max} at 250 and 272 nm. The quinone absorption band at 400 nm was not as visible as in LSV plots, but a slight hyperchromic effect was visible at 330 nm. The Tyr and *p*-Cou electrolysis were conducted at + 1.0 V during 7200 seconds (Figures 3c₂₋₃). The UV spectrum of the final solution did not exhibit a significant modification, attesting that similar chromophores were present with $\lambda_{\max} = 300$ nm for *p*-Cou and $\lambda_{\max} = 275$ nm for Tyr. Spectroelectrochemical measurements of 2 mM Mix showed combined profiles with a weak hypochromic effect at 290 nm and the appearance of a weak 400 nm band absorption on UV-Vis spectra (Figure 3b,c₄). Interestingly, the Mix electrolysis, conducted at + 0.90 V during 7200 seconds, led to similar profiles to Ole electrolysis (Figure 3c₄). After electrolysis, all the solutions were retrieved, saturated with argon in a sealed vial and stored at -20°C before LC-MS² analysis.

Remaining rate of the molecules after electrolysis individually and in the Mix by LC-UV-ESI-MS². In all samples except Mix-seq, the remaining rate of the molecules was measured from the UV-Vis area peaks in the LC-UV-ESI-MS² chromatograms (Figure 4). For each standard, UV-Vis peaks were integrated at the maximal wavelength and considered 100% (i.e. reference). In electrolyzed solutions, the peaks were integrated and expressed as a percentage of the remaining area. Surprisingly, the remaining rate of Ole was higher when its oxidation was conducted in Mix rather than alone, respectively 72% and 21%. To a lesser extent, we also observed a lower oxidation in the Mix for *p*-Cou, respectively 91% and 80%. The calculation was not possible for Tyr because the integration gave a percentage above 100% when oxidized singly putatively due to a similar absorption of some Tyr oxidized products. This Ole protection from oxidation is more likely a regeneration of the starting molecule *via* redox coupled reactions. Indeed, it is known that in a complex environment, a quinone A can oxidize an *ortho*-diphenol B belonging to another redox system with a lower potential E_{redox} , which generates the resulting quinone B and regenerates the *ortho*-diphenol A.^{42,43} However, this is not what is happening here because Ole is the reduced molecule with the lowest redox potential, the monophenols Tyr and *p*-Cou oxidize at approximately + 400 mV higher than Ole. Moreover no other catechol was present in the Mix. Nevertheless, other coupled redox reactions were probably occurring as discussed below.

Characterisation of products by LC-MS² after electrochemical oxidation of Ole. The comparison of LC-ESI-MS chromatograms of 2 mM Ole solutions, before and after electrolysis, showed the appearance of eight new metabolites **O₁₆**, **O_{18a,b}** - **O₂₂** and **O₂₄** at RT 39.8, 40.3, 40.6, 41.2, 41.6 and 42.6 min in oxidized samples (Table 1). Some compounds **O₁₆**, **O₁₉** (*m/z* at 1647)

and **O**₂₄ (*m/z* at 1629) arised from Ole dimerization and trimerization after oxidation and water addition steps as depicted in Scheme 1. Other trimer derivatives appeared such as **O**₂₁, **O**₂₂ and **O**₂₅ and corresponded to a loss of 28 Da (putatively a CO unit) in comparison to **O**₁₉ or **O**₂₄. Compound **O**₂₀ has been already reported from olive-leaf extracts as lucidumoside C.⁴⁴ Nevertheless, in our case, this compound **O**₂₀ at *m/z* 583 probably derived from Michael addition of ethanol on the reactive Ole quinone. **O**_{18a,b} isomers at *m/z* 581 corresponded to the oxidation products of **O**₂₀ with product ions at *m/z* 403 and 535 characteristic respectively of loss of glucoside or ethanol (Scheme 2). A significant increase of **O**₁, **O**₂, **O**₁₀, **O**₁₅, **O**₁₇ and **O**₂₅ was also observed after Ole electrolysis compared to Ole reference in which traces of them were detected. Four of these metabolites have been identified compared to literature data as 3,4-dihydroxyphenylglycol (**O**₁)⁴⁵, 11-methyl-oleoside (**O**₂)¹¹, Ole dimer (**O**₁₅)¹⁶ or Ole quinone (**O**₁₇)¹⁰. Their occurrence could be linked to the oleuropein autoxidation process, notably **O**₁¹⁴ and **O**₁₅¹⁶, but their amount was significantly increased by the electrochemical oxidation as already described using other oxidation methods. Compound **O**₁ has already been reported as an oxidation product of OH-Tyr after enzymatic or Fenton reactions.¹⁴ It was also observed after thermal or waste process of olive oil⁴⁵ like for the metabolite **O**₂.¹¹ Ole quinone **O**₁₇ only appeared after Oleuropein Fenton or periodate oxidations.¹⁰ It is interesting to note that two compounds **O**₅ (10-hydroxy oleuropein) and **O**₁₄ (oleuropein diglucoside), which were in already present our study in the Ole solution reference, were also observed in olive oil wastes¹¹ using LC coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Ole also demonstrated a high sensitivity in water or ethanol under UV light yielding a decomposition into OH-Tyr and elenolic acid or derivatives, followed by oxidation or formation of solvent adducts.⁴⁶ **O**₆ at *m/z* 585 was putatively one of the example of an Ole - ethanol adduct formed in solution. Some differences have been observed in LC-UV-MS² profiles of oxidized Ole and of oxidized Mix samples. Three peaks corresponding to three unknown compounds **O**₄ at *m/z* 573, **O**₈ at *m/z* 617, **O**₉ at *m/z* 431 were detected as higher in Mix oxidized or Mix-seq Ref except for **O**₄ which was only in traces in the latter sample. The most remarkable results concern the presence only in traces of **O**₁₇, **O**₁₉ and **O**_{18b} and the absence of **O**₂₀ in Mix Ox highlighting the indirect protection against oxidation of Ole by native Tyr and *p*-Cou (see 2.3 for remark on redox coupled reactions leading to Ole regeneration in mixes). Indeed, these observations have been confirmed in oxidized Mix-seq, in which Ole was added to (Tyr and *p*-Cou) previously oxidized, and where these compounds, markers of Ole oxidation, were all detected (Table 1). Moreover **O**₄ and the dimer **O**₁₅ were not detected in Mix-seq after oxidation indicating that other oxidative mechanisms occurred when the three monophenols were mixed before electrolysis.

Characterisation of products by LC-MS² after electrochemical oxidation of Tyr. Seven neoformed metabolites labelled **T₁-T₂** and **T₄-T₈** were detected in LC chromatograms of Tyr samples submitted to electrochemical oxidation (Table 2). The three unknown compounds **T₁-T₂** and **T₄** corresponded to high molecular weight compounds with *m/z* at 1794, 1820 and 1499 suggesting an oxidative polymerization. The formation of oligomers has been already reported after enzymatic oxidation of Tyr using peroxidase in presence of H₂O₂.⁴⁷ One dimer (**T₅** at *m/z* 273) (Figure 5), three Tyr trimers (**T₆** and **T₈** at *m/z* 409) and one tetramer (**T₇** at *m/z* 545) were also detected. Chakroun and collaborators have already described the formation of Tyr dimers after enzymatic oxidation using laccase at pH 5 even if the structure proposed in this study⁴⁸ seemed less probable than those proposed later.⁴⁷ The product ions at *m/z* 255 and at *m/z* 243, which correspond to a loss of water and H₂C=O unit, confirmed this structure (Figure 5) which could arise from an *ortho-ortho* oxidative phenolic coupling. All these Tyr oligomers disappeared in the oxidized Mix while some of them were detected in the Mix-seq samples (**T₅** and **T₆**). These observations could be explained by the indirect protection of Tyr oxidation in Mix. Interestingly an oligomer of Tyr has shown higher antioxidant activities compared to Tyr using DPPH assay due to the stability of its phenoxyl radical in *ortho* position.⁴⁷

Characterisation of products by LC-MS² after electrochemical oxidation of *p*-Cou. It has been noted the presence in the reference samples of iso-*p* coumaric acid (**C₃**) which has already been described likely due to photoisomerization.⁴⁹ Two other unknown compounds were also found in non-electrolyzed samples. The electrochemical oxidation of 2 mM *p*-Cou samples resulted in the formation of two dimers **C₄** and **C₅**, identified in LC-MS at *m/z* 325, and two decarboxylated dimers **C₇** and **C₈** with *m/z* 281 (Table 3). The dimers have already been reported using either enzymatic oxidation⁵⁰, Fenton oxidation¹⁰ or for all the dimers using AAPH-induced oxidation². The dimers **C₄** and **C₅** were not present in oxidized Mix and only in traces in Mix-seq, which suggest a similar indirect protection of *p*-Cou in these samples.

Comparison of the chemical profiles between Mix and sequential electrolyzed Mix (Mix-seq). Analysis of LC-ESI-MS² chromatograms of Mix samples highlighted the detection of specific peaks at *m/z* 299 for **M₁** and **M₂** (Figure 6) which could correspond to two isomers, at *m/z* 675 for **M₃** (Figure 7), *m/z* 1195 for **M₄**, **M₅** and **M₆** (Figure 8) and at *m/z* 325 for unknown **M₇** (Table 4). Except for **M₄**, **M₅** and **M₆** which were also detected in the Mix reference samples, all these metabolites were observed after oxidation of Mix or Mix-seq. With respect to their product ions, we suggest that isomers **M₁** and **M₂** resulted from the condensation between Tyr and *p*-Cou after oxidation (Figure 6). The presence of these metabolites in Mix-seq Ref, where only Tyr and *p*-Cou were oxidized, argues in favor of this condensation. Interestingly, in the isomer **M₂**,

the unit derived from oxidized *p*-Cou is close to the structure of graviquinone, recently described as an antitumour and oxidative-stress related metabolite of *p*-Cou methyl ester.³³ **M**₃, which was only detected in Mix Ox (Figure 7), could be assigned to a product derived from addition between Ole and Tyr after oxidation even if the structure could not be confirmed due to the absence of MS² fragmentation. This product should result from the reaction between Ole quinone, derived from Ole oxidation, and a Tyr derivative. Compound **M**₄ derived probably from Ole as some of its product ions could result from the loss of Ole moiety. In the same manner, we were unable to determine its structure. **M**₅ and **M**₆, even if no fragmentation pathway has been observed, could be isomers of **M**₄.

Neuroprotective effect of oxidized Ole and Mix. Our work is in line with into the study of the EVOO-ArOH neuroprotective capacities and how the Mix could synergistically prevent oxidative stress-induced neuronal death, as observed in a previous work.⁹ With this aim, we questioned whether the oxidized compounds from the Mix (Mix Ox) or from Ole (Ole Ox) could prevent H₂O₂-induced neuronal death. Figure 9 shows that Mix Ox and Ole Ox were significantly able to counteract a part of H₂O₂ toxicity after 24h of treatment at very low concentrations (1 and 5 nM), but not at higher concentrations (10 and 50 nM). Firstly, these results suggest that low concentrations of oxidized compounds from Mix Ox and Ole Ox were able to counteract, at least in part, oxidative stress inducing neuronal death. Secondly, this efficiency depended on the concentration used.

We should highlight that the oxidized ArOH-EVOO concentration used to observe a slight neuroprotective activity was one hundred lower than the one observed in our previous work with the native Mix form (tested at 1 and 0.1 μM). Interestingly, there was no difference between the protective effect efficiency of Mix Ox and of Ole Ox. This observation tends to show that oxidation products in Mix Ox were as efficient as Ole Ox even if less oxidation markers of all ArOH-EVOO were present. Therefore, the neuroprotective effect could possibly due to a combination of the native ArOH and the Ole-oxidized compounds. This is in line with several studies which observed that polymerized compounds, which issue from ArOH oxidation maintained antioxidant activities^{51,10} sometimes higher than their native ones^{52,53,47}. Facing the low concentration range used here, we can hypothesize that the Mix oxidation generated interesting oxidative compounds which promote the antioxidant effect through an enhancement of the electron transfer and hydrogen atom transfer capacities compared to the native compounds, as already described^{51,52}. In conclusion a spectroelectrochemical analysis of three major phenolic metabolites from olive oil, either individually or in combination, was carried out in order to highlight some specific reactivities. Careful analysis of LC-ESI-MS² chromatograms led to the highlighting of specific

oxidized products derived from dimerization of Ole, Tyr or *p-Cou* in equimolar mixtures (Mix). The presence of these heterodimers could be linked with the neuroprotective effect against H₂O₂ toxicity observed for oxidized Mix (Mix Ox) or oxidized Ole (Ole Ox) at lower concentrations than for the native equimolar mixture (Mix Ref). These results suggest the relevant role of combination of ArOH-EVOO and their oxidized metabolites (particularly oxidized Ole derivatives) to avoid or delay neuronal death. Taking together, these results suggest that there is a great interest in studying the influence of the ArOH-EVOO oxidation course on their neuroprotective properties and how their oxidized metabolites could impact on the neuronal redox state regulation.

a. AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Abasq M-L. phone: +33 2 23 23 48 95. E-mail: marie-laurence.abasq@univ-rennes1.fr / Tomasi S. phone: +33 2.23.23.48.17. E-mail: sophie.tomasi@univ-rennes1.fr

ORCID

Solenn Ferron: 0000-0002-3509-9982

Aurélie Sauvager : 0000-0002-2838-9623

Charles Ramassamy : [0000-0002-3252-5878](https://orcid.org/0000-0002-3252-5878)

Sophie Tomasi: [0000-0001-9827-527X](https://orcid.org/0000-0001-9827-527X)

Marie-Laurence Abasq : 0000-0001-9640-3055

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This project was supported by Région Bretagne (ARED LichAlz 8964), Louise & André Charron sur la maladie d'Alzheimer (CR), CRSNG and FQRNT.

Notes

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr Sylvain Guyot and Hélène Sotin for P2M2 platform access.

ABBREVIATIONS

ArOH-EVOO phenolic compounds from olive oil; Ole oleuropein; OH-Tyr hydroxytyrosol; HAT H-atom-transfer; ET electron transfer; Tyr tyrosol; *p-Cou* *p*-coumaric acid; SWV Square Wave Voltammetry ; E_{pa} anodic peak; LSV linear sweep voltammetry.

REFERENCES

- (1) Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuno, A.; J.A, D. R. Antioxidant Activity of Phenolics Extracted from *Olea Europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* **2000**, *68*, 457–462.
- (2) Roche, M.; Dufour, C.; Mora, N.; Dangles, O. Antioxidant Activity of Olive Phenols: Mechanistic Investigation and Characterization of Oxidation Products by Mass Spectrometry. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (3), 423–430. <https://doi.org/10.1039/b416101g>.
- (3) Umeno, A.; Takashima, M.; Murotomi, K.; Nakajima, Y.; Koike, T.; Matsuo, T.; Yoshida, Y. Radical-Scavenging Activity and Antioxidative Effects of Olive Leaf Components Oleuropein and Hydroxytyrosol in Comparison with Homovanillic Alcohol. *J Oleo Sci* **2015**, *64* (7), 793–800. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15042>.
- (4) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2013**, *85* (5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.
- (5) Mateos, R.; Trujillo, M.; Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Cert, A.; Espartero, J. L. New Lipophilic Tyrosyl Esters. Comparative Antioxidant Evaluation with Hydroxytyrosyl Esters. *J Agric Food Chem* **2008**, *56* (22), 10960–10966. <https://doi.org/10.1021/jf8020267>.
- (6) Mathew, S.; Abraham, T. E.; Zakaria, Z. A. Reactivity of Phenolic Compounds towards Free Radicals under in Vitro Conditions. *J Food Sci Technol* **2015**, *52* (9), 5790–5798. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1704-0>.
- (7) Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Mateos, R.; Espartero, J. L. Preparation and Antioxidant Activity of Tyrosyl and Homovanillyl Ethers. *Food Chem* **2011**, *129* (3), 1169–1178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.098>.
- (8) Espinosa, R. R.; Inchingolo, R.; Alencar, S. M.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Castro, I. A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Added to a Functional Emulsion Containing Omega-3 Fatty Acids and Plant Sterol Esters. *Food Chemistry* **2015**, *182*, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.130>.
- (9) Lambert de Malezieu, M.; Courtel, P.; Sleno, L.; Abasq, M.L.; Ramassamy, C. Synergistic Properties of Bioavailable Phenolic Compounds from Olive Oil: Electron Transfer and Neuroprotective Properties. *Nutritional Neurosciences* **submitted**.
- (10) Antolovich, M.; Bedgood, D. R., Jr.; Bishop, A. G.; Jardine, D.; Prenzler, P. D.; Robards, K. LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. *J Agric Food Chem* **2004**, *52* (4), 962–971. <https://doi.org/10.1021/jf0349883>.
- (11) Cardoso Susana, M.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lopes-da-Silva José, A.; Renard Catherine, M. G. C.; Coimbra Manuel, A. Characterisation of Phenolic Extracts from Olive Pulp and Olive

Pomace by Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, *85* (1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1925>.

(12) Cardoso, S. M.; Guyot, S.; Marnet, N.; Lopes-da-Silva, J. A.; Silva, A. M. S.; Renard, C. M. G. C.; Coimbra, M. A. Identification of Oleuropein Oligomers in Olive Pulp and Pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86* (10), 1495–1502. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2532>.

(13) Obied, H. K.; Bedgood, D. R.; Prenzler, P. D.; Robards, K. Chemical Screening of Olive Biophenol Extracts by Hyphenated Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *603* (2), 176–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.044>.

(14) Di Maio, I.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Selvaggini, R.; Veneziani, G.; Urbani, S.; Servili, M. HPLC–ESI-MS Investigation of Tyrosol and Hydroxytyrosol Oxidation Products in Virgin Olive Oil. *Food Chemistry* **2011**, *125* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.025>.

(15) Klen, Tina Jerman, T.; Wondra, Alenka Golc; Vrhovšek, U.; Vodopivec, Branka Branka Mozetic ozetič. Phenolic Profiling of Olives and Olive Oil Process-Derived Matrices Using UPLC-DAD-ESI-QTOF-HRMS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63* (15), 3859–3872. <https://doi.org/10.1021/jf506345q>.

(16) Gentile, L.; Uccella, N. A.; Sivakumar, G. Soft-MS and Computational Mapping of Oleuropein. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050992>.

(17) St-Laurent-Thibault, C.; Arseneault, M.; Longpre, F.; Ramassamy, C. Tyrosol and Hydroxytyrosol, Two Main Components of Olive Oil, Protect N2a Cells against Amyloid-Beta-Induced Toxicity. Involvement of the NF-KappaB Signaling. *Current Alzheimer research* **2011**, *8* (5), 543–551.

(18) Pasban-Aliabadi, H.; Esmaeili-Mahani, S.; Sheibani, V.; Abbasnejad, M.; Mehdizadeh, A.; Yaghoobi, M. M. Inhibition of 6-Hydroxydopamine-Induced PC12 Cell Apoptosis by Olive (*Olea Europaea* L.) Leaf Extract Is Performed by Its Main Component Oleuropein. *Rejuvenation research* **2013**, *16* (2), 134–142. <https://doi.org/10.1089/rej.2012.1384>.

(19) Peng, S.; Zhang, B.; Yao, J.; Duan, D.; Fang, J. Dual Protection of Hydroxytyrosol, an Olive Oil Polyphenol, against Oxidative Damage in PC12 Cells. *Food Funct* **2015**, *6* (6), 2091–2100. <https://doi.org/10.1039/c5fo00097a>.

(20) Sun, W.; Wang, X.; Hou, C.; Yang, L.; Li, H.; Guo, J.; Huo, C.; Wang, M.; Miao, Y.; Liu, J.; et al. Oleuropein Improves Mitochondrial Function to Attenuate Oxidative Stress by Activating the Nrf2 Pathway in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Spontaneously Hypertensive Rats. *Neuropharmacology* **2017**, *113* (Pt A), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.010>.

- (21) 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. *JAOCS* **2003**, *80* (10), 1007–1012.
- (22) Belkacemi, A.; Ramassamy, C. Innovative Anthocyanin/Anthocyanidin Formulation Protects SK-N-SH Cells Against the Amyloid-Beta Peptide-Induced Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **2015**, *16* (1), 37–49.
- (23) Belkacemi, A.; Ramassamy, C. Anthocyanins Protect SK-N-SH Cells Against Acrolein-Induced Toxicity by Preserving the Cellular Redox State. *J Alzheimers Dis* **2016**, *50* (4), 981–998. <https://doi.org/10.3233/JAD-150770>.
- (24) Visioli, F.; Caruso, D.; Plasmati, E.; Patelli, R.; Mulinacci, N.; Romani, A.; Galli, G.; Galli, C. Hydroxytyrosol, as a Component of Olive Mill Waste Water, Is Dose- Dependently Absorbed and Increases the Antioxidant Capacity of Rat Plasma. *Free Radic Res* **2001**, *34* (3), 301–305.
- (25) Schaffer, S.; Podstawa, M.; Visioli, F.; Bogani, P.; Muller, W. E.; Eckert, G. P. Hydroxytyrosol-Rich Olive Mill Wastewater Extract Protects Brain Cells in Vitro and Ex Vivo. *J Agric Food Chem* **2007**, *55* (13), 5043–5049. <https://doi.org/10.1021/jf0703710>.
- (26) Peng, Y.; Hou, C.; Yang, Z.; Li, C.; Jia, L.; Liu, J.; Tang, Y.; Shi, L.; Li, Y.; Long, J.; et al. Hydroxytyrosol Mildly Improve Cognitive Function Independent of APP Processing in APP/PS1 Mice. *Mol Nutr Food Res* **2016**, *60* (11), 2331–2342. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600332>.
- (27) Cornwell, D. G.; Ma, J. Studies in Vitamin E: Biochemistry and Molecular Biology of Tocopherol Quinones. *Vitamins and hormones* **2007**, *76*, 99–134. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76005-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76005-3).
- (28) Yubero-Serrano, E. M.; Lopez-Moreno, J.; Gomez-Delgado, F.; Lopez-Miranda, J. Extra Virgin Olive Oil: More than a Healthy Fat. *European Journal of Clinical Nutrition* **2018**. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0304-x>.
- (29) Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. The Metabolic Fate of Dietary Polyphenols in Humans. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, *33* (2), 220–235. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00877-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00877-8).
- (30) Visioli, F.; Caruso, D.; Galli, C.; Viappiani, S.; Galli, G.; Sala, A. Olive Oils Rich in Natural Catecholic Phenols Decrease Isoprostane Excretion in Humans. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *278* (3), 797–799. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3879>.
- (31) Corona, G.; Tzounis, X.; Assunta Dessì, M.; Deiana, M.; Debnam, E. S.; Visioli, F.; Spencer, J. P. E. The Fate of Olive Oil Polyphenols in the Gastrointestinal Tract: Implications of Gastric and Colonic Microflora-Dependent Biotransformation. *Free Radical Research* **2006**, *40* (6), 647–658. <https://doi.org/10.1080/10715760500373000>.

- (32) de Bock, M.; Thorstensen, E. B.; Derraik, J. G. B.; Henderson, H. V.; Hofman, P. L.; Cutfield, W. S. Human Absorption and Metabolism of Oleuropein and Hydroxytyrosol Ingested as Olive (*Olea Europaea* L.) Leaf Extract. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57* (11), 2079–2085. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200795>.
- (33) Fási, L.; Di Meo, F.; Kuo, C.-Y.; Stojkovic Buric, S.; Martins, A.; Kúsz, N.; Béni, Z.; Dékány, M.; Balogh, G. T.; Pesic, M.; et al. Antioxidant-Inspired Drug Discovery: Antitumor Metabolite Is Formed in Situ from a Hydroxycinnamic Acid Derivative upon Free-Radical Scavenging. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62* (3), 1657–1668. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01994>.
- (34) Parvez, S.; Long, M. J. C.; Poganik, J. R.; Aye, Y. Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants. *Chemical Reviews* **2018**, *118* (18), 8798–8888. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00698>.
- (35) Lipton, S. A.; Rezaie, T.; Nutter, A.; Lopez, K. M.; Parker, J.; Kosaka, K.; Satoh, T.; McKercher, S. R.; Masliah, E.; Nakanishi, N. Therapeutic Advantage of Pro-Electrophilic Drugs to Activate the Nrf2/ARE Pathway in Alzheimer's Disease Models. *Cell Death Dis* **2016**, *7* (12), e2499. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.389>.
- (36) Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F. Reversed-Phase HPLC Following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus Domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (5), 1698–1705. <https://doi.org/10.1021/jf970832p>.
- (37) Enache, T. A.; Amine, A.; Brett, C. M. A.; Oliveira-Brett, A. M. Virgin Olive Oil Ortho-Phenols—Electroanalytical Quantification. *Talanta* **2013**, *105*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.055>.
- (38) Paradiso, V. M.; Di Mattia, C.; Giarnetti, M.; Chiarini, M.; Andrich, L.; Caponio, F. Antioxidant Behavior of Olive Phenolics in Oil-in-Water Emulsions. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (29), 5877–5886. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01963>.
- (39) Costentin, C. Electrochemical Approach to the Mechanistic Study of Proton-Coupled Electron Transfer. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (7), 2145–2179. <https://doi.org/10.1021/cr068065t>.
- (40) Enache, T. A.; Oliveira-Brett, A. M. Phenol and Para-Substituted Phenols Electrochemical Oxidation Pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, *655* (1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>.

- (41) Costentin, C.; Robert, M.; Savéant, J.-M. Concerted Proton–Electron Transfers: Electrochemical and Related Approaches. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (7), 1019–1029. <https://doi.org/10.1021/ar9002812>.
- (42) Cheynier, V.; Rigaud, J.; Moutounet, M. Oxidation Kinetics of Trans-Caffeoyltartrate and Its Glutathione Derivatives in Grape Musts. *Phytochemistry* **1990**, *29* (6), 1751–1753. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85008-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85008-4).
- (43) Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Structural Determination of Colourless and Yellow Dimers Resulting from (+)-Catechin Coupling Catalysed by Grape Polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42* (5), 1279–1288. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00127-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00127-6).
- (44) Quirantes-Piné, R.; Lozano-Sánchez, J.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. HPLC-ESI-QTOF-MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-Leaf Extracts: Characterisation of Phenolic Compounds from Olive Leaves. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24* (3), 213–223. <https://doi.org/10.1002/pca.2401>.
- (45) Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J. L.; Fernández-Bolaños, J. Isolation of a Powerful Antioxidant from *Olea Europaea* Fruit-Mill Waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Science and Technology* **2009**, *42* (2), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.015>.
- (46) Longo, E.; Morozova, K.; Scampicchio, M. Effect of Light Irradiation on the Antioxidant Stability of Oleuropein. *Food Chem* **2017**, *237*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.099>.
- (47) Antenucci, S.; Panzella, L.; Farina, H.; Ortenzi, M. A.; Caneva, E.; Martinotti, S.; Ranzato, E.; Burlando, B.; d'Ischia, M.; Napolitano, A.; et al. Powering Tyrosol Antioxidant Capacity and Osteogenic Activity by Biocatalytic Polymerization. *RSC Advances* **2016**, *6* (4), 2993–3002. <https://doi.org/10.1039/c5ra23004g>.
- (48) Chakroun, H.; Bouaziz, M.; Yangui, T.; Blibech, I.; Dhouib, A.; Sayadi, S. Enzymatic Transformation of Tyrosol by *Trametes Troglia* Laccases: Identification of the Product and Study of Its Biological Activities. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *87*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.10.006>.
- (49) Šmejkalová, D.; Piccolo, A.; Spiteller, M. Oligomerization of Humic Phenolic Monomers by Oxidative Coupling under Biomimetic Catalysis. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (22), 6955–6962. <https://doi.org/10.1021/es061127c>.
- (50) Chakroun, H.; Bouaziz, M.; Dhouib, A.; Sayadi, S. Enzymatic Oxidative Transformation of Phenols by *Trametes Troglia* Laccases. *Environ Technol* **2012**, *33* (16–18), 1977–1985. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.655317>.

(51) Hapiot, P.; Neudeck, A.; Pinson, J.; Fulcrand, H.; Neta, P.; Rolando, C. Oxidation of Caffeic Acid and Related Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1996**, *405* (1), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(95\)04412-4](https://doi.org/10.1016/0022-0728(95)04412-4).

(52) Zhang, D.; Wang, C.; Shen, L.; Shin, H.-C.; Lee, K. B.; Ji, B. Comparative Analysis of Oxidative Mechanisms of Phloroglucinol and Dieckol by Electrochemical, Spectroscopic, Cellular and Computational Methods. *RSC Advances* **2018**, *8* (4), 1963–1972. <https://doi.org/10.1039/c7ra10875c>.

(53) Di Gennaro, P.; Sabatini, V.; Fallarini, S.; Pagliarin, R.; Sello, G. Polyphenol Polymerization by an Alternative Oxidative Microbial Enzyme and Characterization of the Biological Activity of Oligomers. *BioMed research international* **2018**, *2018*, 3828627–3828627. <https://doi.org/10.1155/2018/3828627>.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Structure of studied ArOH-EVOO

Figure 2. SW voltammograms of ArOH 25 μM in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 vs. Ag/AgCl reference electrode using a GCE working electrode, scan rate 0.05 V.s⁻¹. a) Ole; b) Tyr; c) *p*-Cou. A1: first oxidation peak; C1: cathodic peak on the reverse scan when visible. Black lines: first scan; Blue lines: second scan. i_t : total current; i_f : forward current; i_b : backward current.

Figure 3. Spectroelectrochemical measurements of ArOH and Mix 2 mM in phosphate buffer 0.1M at pH 7.4. a) LSV were analyzed at a platinum grid working electrode vs. Ag/AgCl reference electrode, scan rate 0.005 V.s⁻¹. b) In situ thin layer UV–vis spectra in function of potential measured during the LSV. c) In situ thin layer UV–vis spectra in function of time of ArOH and Mix subjected to oxidation at a fixed E_{pa} (+ 0.7 V for Ole, + 0.9 V for Mix, + 1.0 V for *p*-Cou and Tyr) during 7200 sec. The first spectrum was recorded after 15 sec, measurements were repeated every 20 sec. Only spectral plots recorded every 900 sec were represented.

Figure 4. Remaining rate of native ArOH after oxidation at a platinum electrode during 7200 sec at a fixed potential ($E_{pa} + 0.7$ V for Ole, $E_{pa} + 0.90$ V for the Mix and $E_{pa} + 1.0$ V for Tyr and *p*-Cou). Native and oxidized solutions were analysed by LC-UV-ESI-MS². Peak areas were measured at 250 and 280 nm for Ole ($t_r = 38.8$ min), 280 for Tyr ($t_r = 14.5$ min) and 310 for *p*-Cou ($t_r = 29.3$ min).

Figure 5 Proposed structure of Tyr dimer **T₅**

Figure 6. LC-ESI/MS and MS² analysis in negative mode of compounds **M₁** and **M₂** before and after electrolysis of Mix or Mix seq. a) Extracted ion chromatograms of compounds **M₁** and **M₂** at

m/z 299. b) ESI-MS spectrum of compounds **M**₁ and **M**₂ at 34.9 and 37.4 min at 35 eV collision energy.

Figure 7. LC-ESI/MS and MS² analysis in negative mode of compound **M**₃ before and after electrolysis of Mix or Ole. a) Extracted ion chromatograms of compound **M**₃ at *m/z* 675. b) ESI-MS spectrum of compound **M**₃ at 37.9 min at 35 eV collision energy.

Figure 8. LC-ESI/MS and MS² analysis in negative mode of compounds **M**₄-**M**₆ before and after electrolysis of Mix or Mix-seq. a) Extracted ion chromatograms of compounds **M**₄-**M**₆ at *m/z* 1195. b) ESI-MS spectrum of compounds **M**₄-**M**₆ at 48.3, 48.4 and 48.8 min at 35 eV collision energy.

Figure 9. Neuroprotective capacity of the oxidized Mix (Mix Ox) and the oxidized Ole (Ole Ox). SK-N-SH neuronal cells were treated 24h with H₂O₂ (200 μM) either in absence or in presence of Mix Ox or Ole Ox at different concentrations. Data are mean ± SEM from three separate experiments performed in sextuplicate for each group with **p < 0.01 and ***p < 0.001 indicating a statistically significant difference versus H₂O₂-treated group using Dunnett's-t test.

Scheme 1. Proposed mechanism of oleuropein dimerization and trimerization after oxidation and water addition.

Scheme 2. Proposed mechanism of O₂₀ and O_{18a,b} formation

Table 1. Oleuropein data after LC-ESI-MS² analysis of Ole, Mix and Mix-seq before and after electrochemical oxidation

Compound Name	RT (min)	λ max (nm)	m/z	Ole 2mM		Mix 2mM		Mix-seq 2mM (Tyr + p-Cou) Ox + Ole Ref		MS ²				
				Ref	Ox	Ref	Ox	Ox	Ox					
O1	3,4-Dihydroxyphenylglycol	4.1	280	169	traces	+	-	+	-	+	151 (-18)	123 (-46)		
O2	11-Methyl-oleoside	22.0	< 240	403	traces	+	traces	+	+	+	223 (-180)	179 (-224)	359 (-CO ₂)	161 (-242)
O3	unknown	30.8		587	+	+	+	+	+	+	543 (-44)		403 (-184)	
O4	unknown	32.4	288	573	+	traces	traces	+	traces	-	529 (-44)	403 (-170)	222 (-350)	
O5	10- Hydroxy-oleuropein	35.1		555	+	+	+	+	+	+	537 (-H ₂ O)	393 (162)	403 (-152)	
O6	Oleuropein + [EtOH]	35.8	244 / 307	585	+	+	+	+	+	+	523 (-62)	541 (-44)	361 (-224)	199 (-386)
O7	unknown	37.0	255	615	+	+	+	+	+	+	423 (-191)	455 (-160)	273 (-344)	551 (-64)
O8	unknown	37.8	266 / 336	617	traces	traces	-	+	+	+	423 (-194)	455 (-162)	273 (-344)	585 (-32)
O9	unknown	38.0	266 / 337	431	+	traces	+	+	+	+	269 (-162)			
O10	unknown	38.3	267 / 344	567	traces	+	traces	+	-	+	373 (-194)	403 (-164)	223 (-344)	
O11		38.3		461	+	+	+	+	+	+	299 (-162)	446 (-15)	307 (-154)	
O12	Oleuropein	38.4	278	539	+	+	+	+	+	+	377 (-162)	307 (-232)	275 (-264)	
O13	unknown	38.6	-	553	+	+	traces	+	+	+	403 (-150)	223 (-330)	179 (-374)	
O14	Oleuropein diglucoside	38.6	309	701	+	+	+	+	+	+	377 (-324)	307 (394)	275 (-426)	
O15	Ole dimer [(2M -2H) - H] ⁻	39.5		1077	traces	+	traces	+	traces	-	673 (-404)	813 (-264)	539 (-538)	
O16	Ole quinone dimer derivative [(2M + H ₂ O - 4H) - H] ⁻	39.8	263 / 420	1091	-	+	-	+	traces	+	687 (-404)	403 (-688)	525 (-56)	
O17	Oleuropein quinone	39.9	295	537	traces	+	traces	traces	traces	+	-			
O18a	Lucidumoside C oxidized	40.3	259 / 434	581	-	+	-	+	+	+	535 (-46)	403 (-178)		
O19	Ole oxidized trimer [(3M + 2H ₂ O - 4H) - H] ⁻	40.3		1647	-	+	-	traces	-	+	685 (-962)		1109 (-538)	
O20	Lucidumoside C	40.6	255 / 350	583	-	+	-	-	+	+	537 (-46)			
O18b	Lucidumoside C oxidized	41.0	< 240 / 412	581	-	+	+	traces	+	+				
O21	Ole trimer derivative	41.2	280	1619	-	+	-	+	+	+	1575 (-CO ₂)	1557 (-CO ₂ , -H ₂ O)	1019	
O22	Iso Ole trimer derivative	41.6	280	1619	-	+	-	+	+	+	1575	1557	1019	

O23	Iso Ole dimer [(2M -2H) - H] ⁻	41.7		1077	+	-	+	-	traces	-	813 (-264)	673 (-404)	539 (-538)	
O24	Ole trimer derivative	42.6	281	1629	-	+	-	+	+	+	1019	1045	1585	1091
O25	Ole trimer derivative	43.6	285	1601	traces	+	-	+	traces	+	1197		793	

Table 2. Tyrosol data after LC-ESI-MS² analysis of Ole, Mix and Mix-seq before and after electrochemical oxidation

Compound name	RT (min)	λ max (nm)	m/z	Tyr 2mM		Mix 2mM		Mix-seq 2mM (Tyr + p-Cou) Ox		MS ²			
				Ref	Ox	Ref	Ox	Ox	Ox + Ole Ref				
T1	unknown	10.4	-	1794	-	+	-	-	-	-			
T2	unknown	12.9	280	1820	-	+	-	-	-	-	1761 (-59)		
T3	Tyrosol	14.6	275	502	+	+	+	+	+	+	365 (-Tyr)	228 (-Tyr dim)	
				402	+	+	+	+	+	+	+		265 (-Tyr)
				273	+	+	+	+	+	+	+		
T4	unknown	17.8	285	1499	-	+	-	-	-	-	1449 (-50)	1414 (-85)	1240 (-259)
T5	Tyrosol dimer	34.0	280	273	-	+	-	traces	+	+	243 (-CH ₂ O)	255 (-H ₂ O)	
T6	Tyrosol trimer	38.1	nd	409	-	+	-	traces	+	+	391 (-H ₂ O)	341 (-68)	273 (-Tyr ox)
T7	Tyrosol tetramer	39.4	275 - 280	545	-	+	-	-	traces	-	409 (-Tyr ox)		
T8	Tyrosol trimer	40.0		409		+	-	-	-	-	271 (-neutral Tyr)	341 (-68)	136 (-Tyr dim)

Table 3: *p*-Coumaric acid data after LC-ESI-MS² analysis of Ole, Mix and Mix-seq before and after electrochemical oxidation

Compound name	RT (min)	λ max (nm)	m/z	<i>p</i> -Cou 2mM		Mix 2mM		Mix-seq 2mM (Tyr + <i>p</i> -Cou)		MS ²
				Ref	Ox	Ref	Ox	Ox	Ox	
C1 <i>p</i> -coumaric acid	28.9	308	163	+	+	+	+	+	+	119 (-CO ₂)
C2 <i>iso-p</i> -coumaric acid (<i>m</i> - or <i>o</i> -)	31.8	295	163	+	+	+	traces	+	+	126 (-37) 119 (-CO ₂)
C3 unknown	35.1	-	497	+	+	-	-	-	-	-
C4 <i>p</i> -coumaric acid dimer	38.8	305	325	-	+	-	-	traces	traces	281 (-CO ₂) 237 (-2CO ₂)
C5 <i>p</i> -coumaric acid dimer	40.0	305	325	-	+	-	-	traces	traces	281 (-CO ₂)
C6 unknown	48.9	-	271	+	+	-	-	+	-	213 (-58)
C7 decarboxylated <i>p</i> -coumaric acid dimer	41.8	300 / 316	281	-	+	-	+	+	+	237 (-CO ₂)
C8 decarboxylated <i>p</i> -coumaric acid dimer	42.3	292 / 330	281	-	+	+	+	+	+	

Table 4: LC-ESI-MS² analysis of Mix and Mix-seq before and after electrochemical oxidation

Compound name	RT (min)	λ max (nm)	m/z	Mix 2mM		Mix-seq 2mM (Tyr + <i>p</i> -Cou)		MS ²
				Ref	Ox	Ox	Ox	
M1 [(Tyr - <i>p</i> -Cou -2H)-H] ⁻	34.9		299	-	+	+	+	255 (-CO ₂) 135 (-164)
M2 [(Tyr - <i>p</i> -Cou -2H)-H] ⁻	37.4		299	-	+	+	+	255 (-CO ₂) 135 (-164)
M3 [(Tyr - Ole -2H)-H] ⁻	37.9		675	-	+	-	-	
M4 unknown	43.3	245 / 284	1195	+	+	+	+	655 (-Ole) 791 (-11-methyl oleoside) 1033 (-glu) 963 403 539 1163 (-O ₂) 657 (- Ole Ox)
M5 unknown	43.4	245 / 284	1195	+	+	+	+	
M6 unknown	43.8	245 / 284	1195	+	+	+	+	
M7 unknown	48.3	305	25	-	+	+	+	281 (-CO ₂)

Table 5: Potentials E_{pa} , E_{fixed} of ArOH and Mix solutions (2 mM), respectively measured in LSV and applied for electrolysis $i = f(t)$ experiments.

Sample	Ole	<i>p</i> -Cou	Tyr	Mix
E_{pa} (V) measured from LSV $i = f(E)$	+ 0.32	+ 0.54	+ 0.59	+ 0.27 + 0.65
E_{fixed} (V) applied for electrolysis $i = f(t)$	+ 0.70	+ 1.00	+ 1.00	+ 0.90

Figure 1

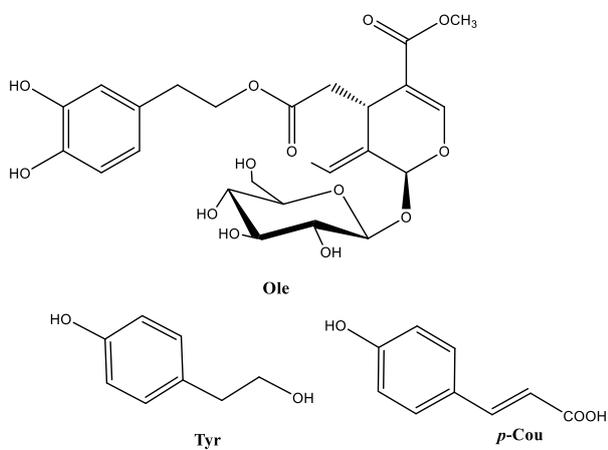


Figure 2

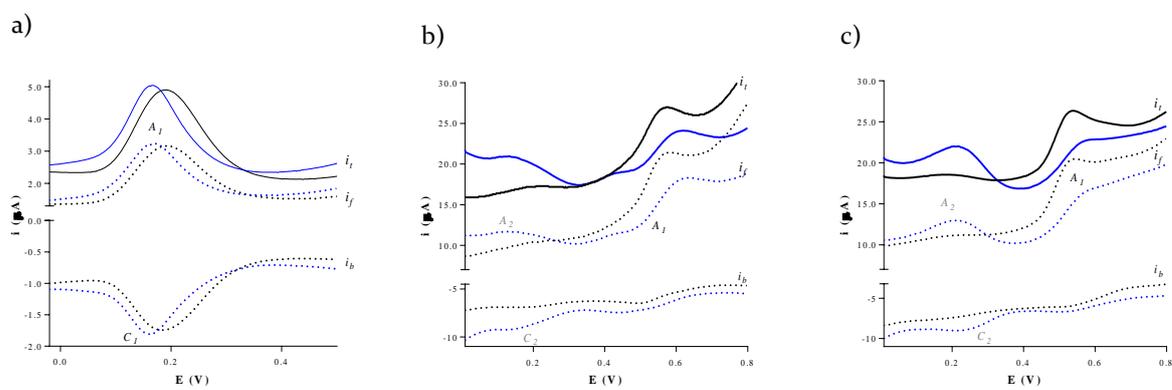


Figure 3

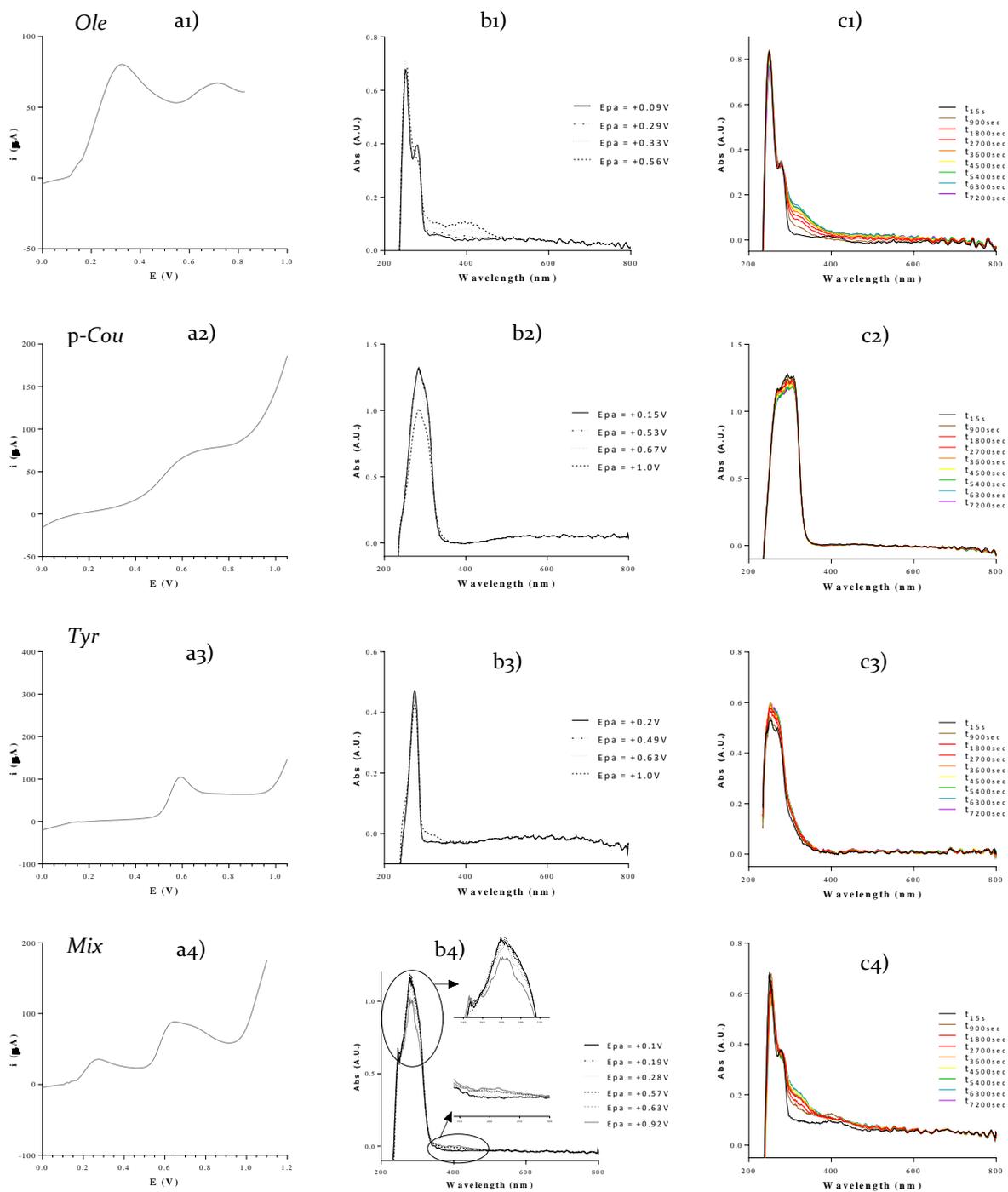


Figure 4

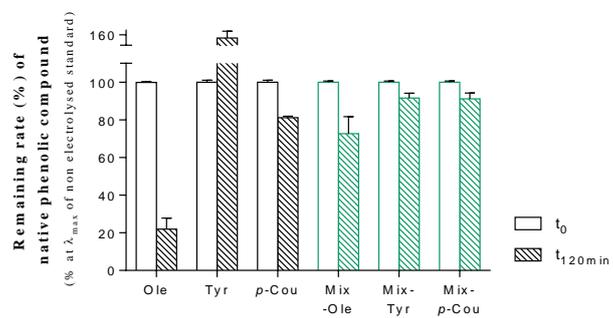


Figure 5

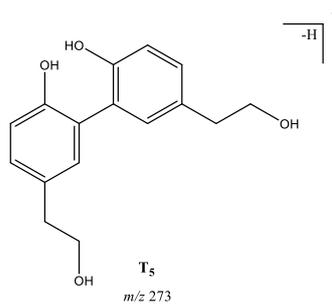


Figure 6

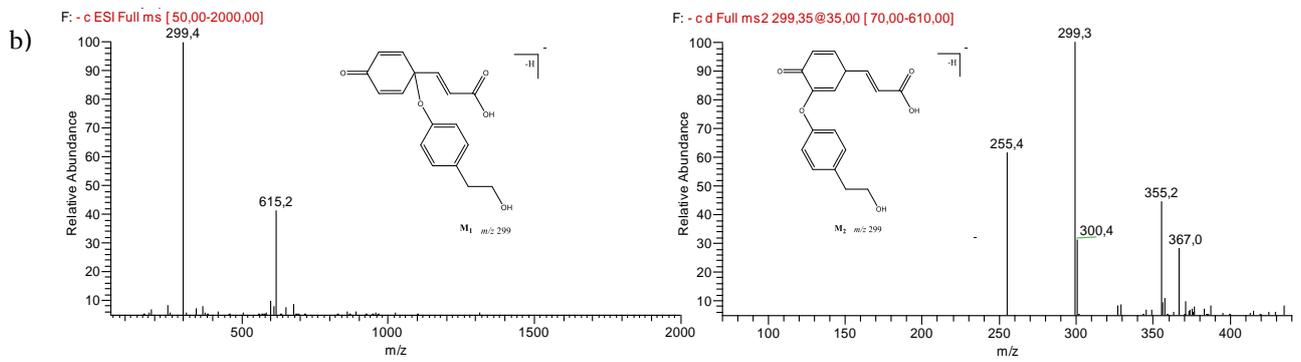
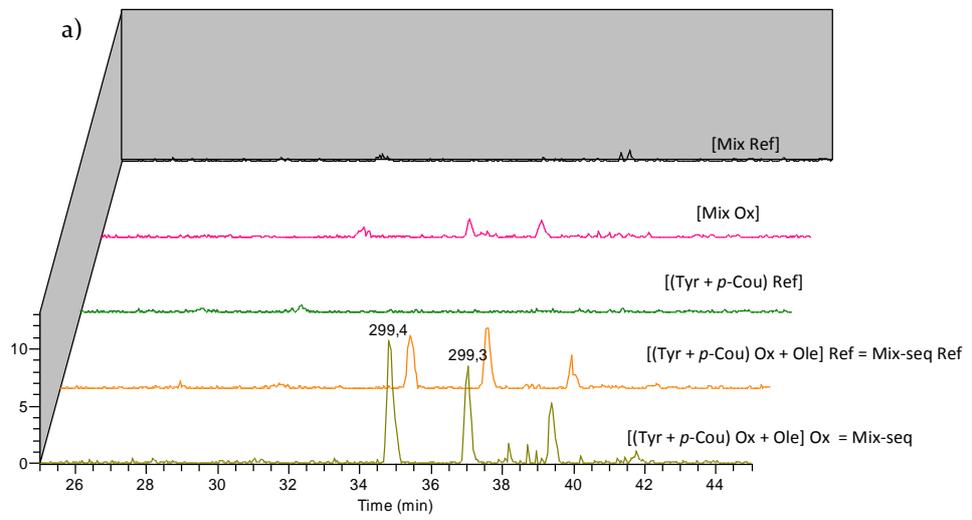


Figure 7

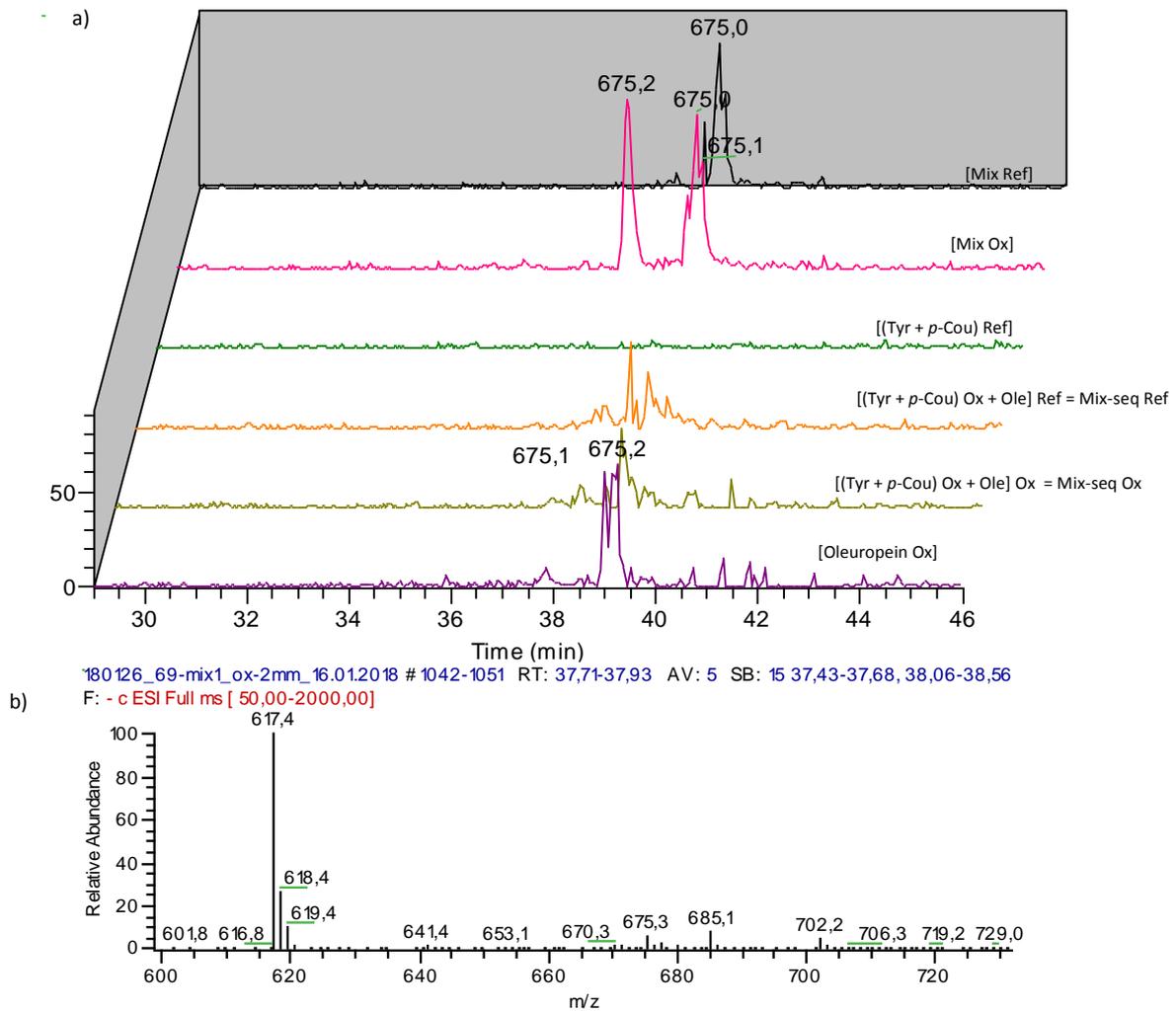


Figure 8

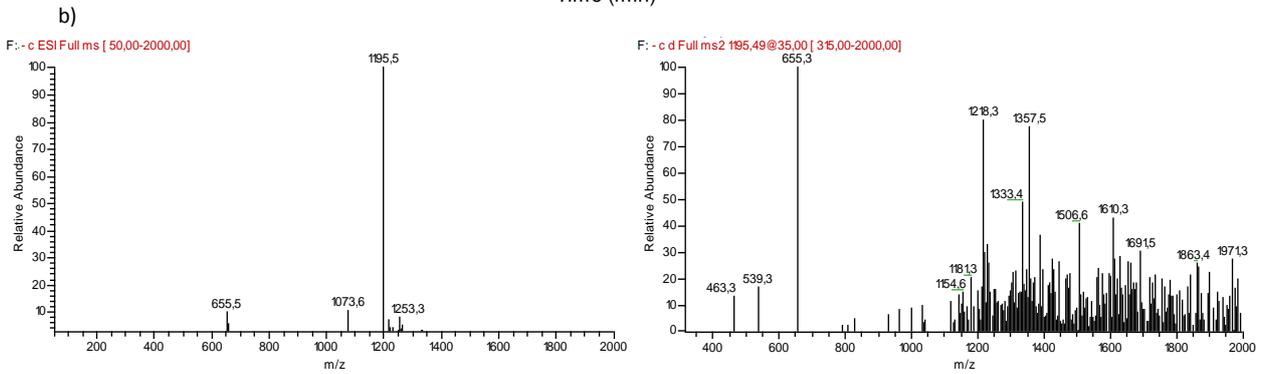
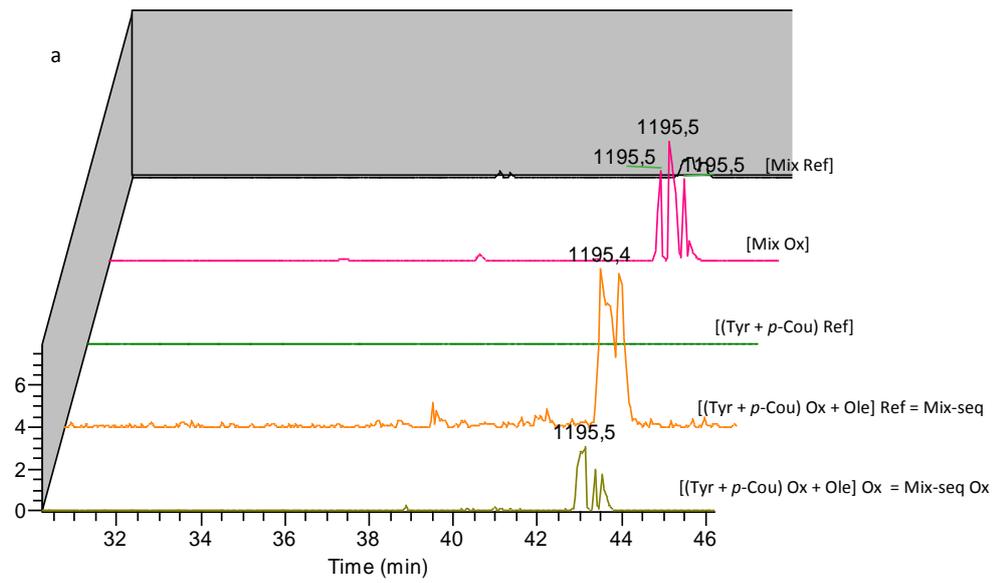
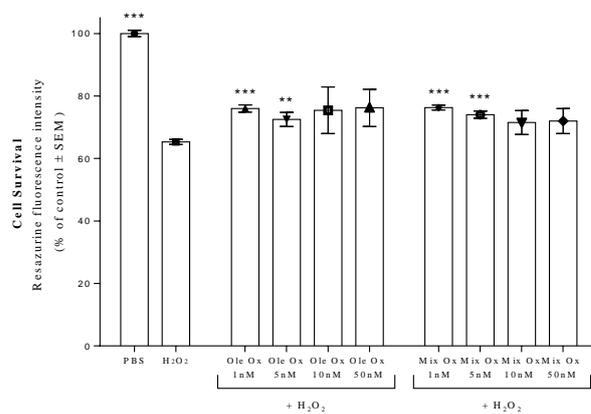
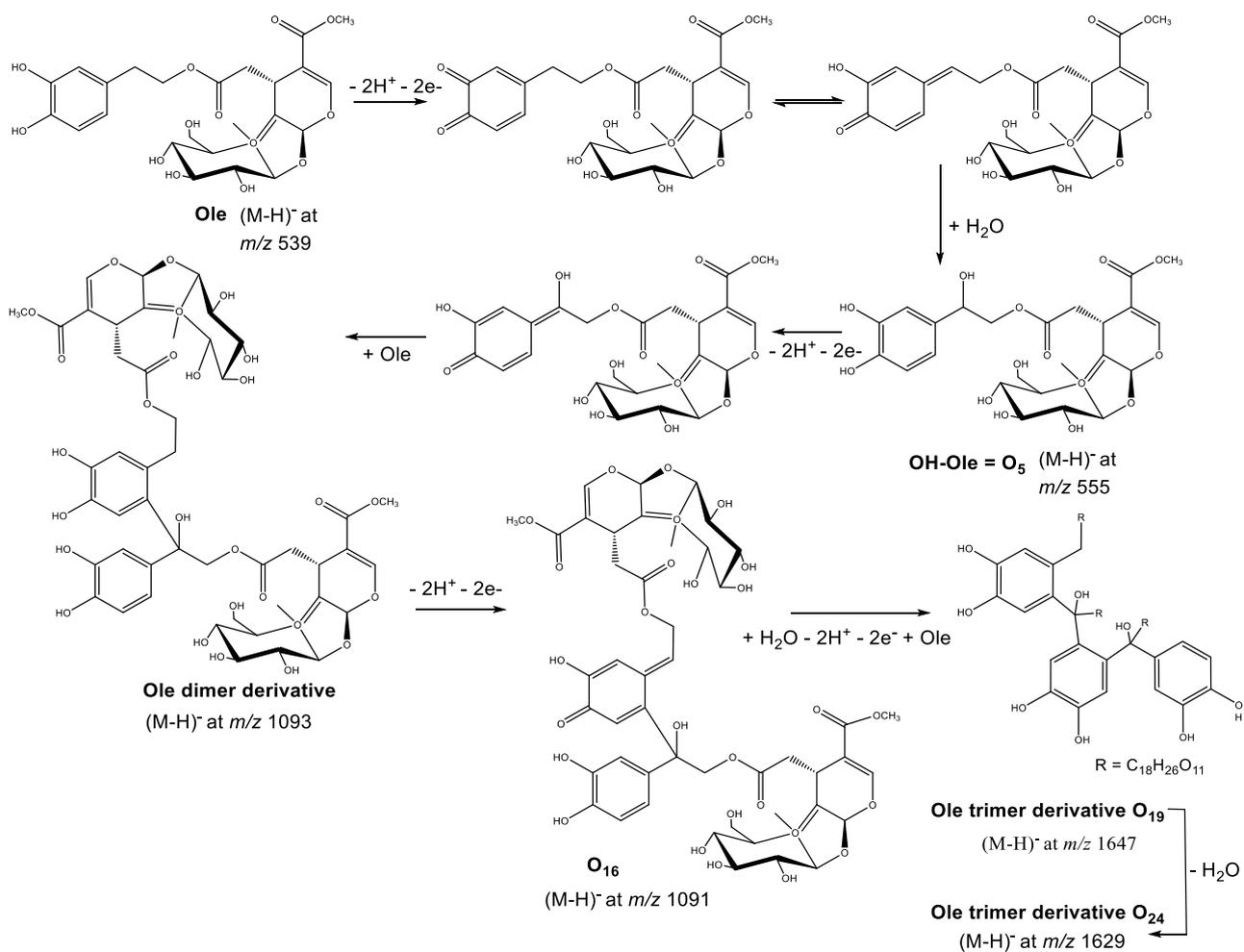


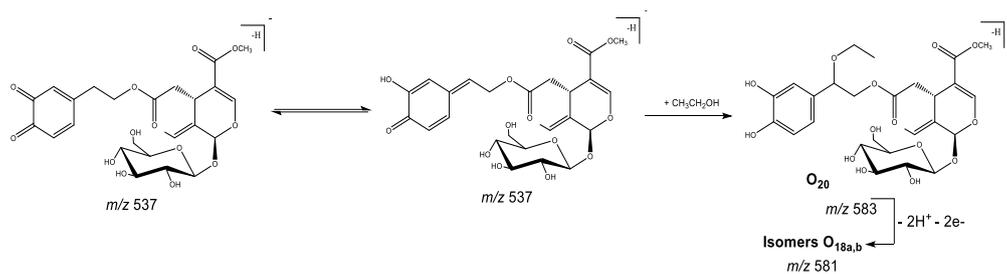
Figure 9



Scheme 1



Scheme 2



CHAPITRE 4

**OBSERVATION DES MÉTABOLITES DE COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES DANS LES CELLULES NEURONALES EN
CONDITIONS BASALES OU EN CAS DE STRESS
OXYDATIF : TRAVAUX PRÉLIMINAIRES**

I. Introduction

L'intérêt des molécules naturelles pour prévenir et limiter le développement des maladies neurodégénératives telles que la MA ou la MP peut être limité par la biodisponibilité des composés. Afin de déterminer le potentiel neuroprotecteur d'un composé, il convient de connaître sa biodisponibilité au niveau cérébral. Plusieurs études ont démontré la présence de composés phénoliques issus de l'huile d'olive dans les cerveaux de rats après administration des composés phénoliques (D'Angelo, Manna et al. 2001, Gasperotti, Passamonti et al. 2015, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018) ou de résidus issus de la fabrication de l'huile d'olive riche en composés phénoliques (Serra, Rubio et al. 2012, López de las Hazas, Piñol et al. 2016).

Certains de ces composés phénoliques sont retrouvés fortement métabolisés. Ainsi, contrairement à l'acide *p*-coumarique (Gasperotti, Passamonti et al. 2015), l'oleuropéine n'a pas été retrouvée sous forme native, mais sous forme de dérivés, alors que le tyrosol ou l'hydroxytyrosol sont retrouvés sous formes sulfatées (Serra, Rubio et al. 2012).

Dans le plasma, ces composés sont retrouvés sous formes glucuronidées, sulfatées et méthylées, correspondant à des modifications enzymatiques de phase II (Visioli, Galli et al. 2000). D'Angelo et al. suggèrent que les profils des métabolites observés dans le plasma sont similaires à ceux observés dans les autres organes, dont le cerveau (D'Angelo, Manna et al. 2001). Cependant, ils présument une possible méthylation de l'hydroxytyrosol au niveau cérébral soutenue par une plus forte concentration de son dérivé méthylé, l'alcool homovanillique. La catéchol-*O*-methyl transférase (COMT), enzyme responsable de la méthylation de l'hydroxytyrosol, possède des rôles métaboliques de premier ordre dans le cerveau, particulièrement à travers le métabolisme de la dopamine (Guldborg and Marsden 1975). Il convient de rappeler que l'hydroxytyrosol est aussi un composé endogène. Il est issu d'une voie de dégradation de la dopamine à travers l'action de la monoamine-oxydase (MAO) suivie de l'action de l'aldéhyde déshydrogénase. Bien que cette voie métabolique soit minoritaire, la dopamine étant préférentiellement prise en charge par la COMT, elle mérite d'être prise en compte dans l'étude des composés phénoliques de l'huile d'olive au niveau cérébral. En effet, plusieurs composés issus du métabolisme de la dopamine sont aussi des composés retrouvés lors de l'oxydation de l'hydroxytyrosol *in vitro*. Par exemple, le DOPAL (3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde), observé après l'oxydation de l'hydroxytyrosol par la réaction de Fenton (Di Maio, Esposto et al. 2011), est un métabolite issu de la dégradation de la dopamine. De plus, le tyrosol est aussi un composé pouvant être produit de manière endogène suite au métabolisme de la tyrosine par l'action de la MAO et de l'aldéhyde/aldose réductase (Rodriguez-Morato, Boronat et al. 2016).

Bien que l'hydroxytyrosol n'ait pas été utilisé dans le Mix1, sa métabolisation est importante à prendre en compte dans notre étude. En effet, l'oleuropéine, présente dans le Mix1, peut être hydrolysée et générer la libération de sa moitié hydroxytyrosol lors du métabolisme digestif (Corona, Tzounis et al. 2006, de Bock, Thorstensen et al. 2013), entraînant ainsi la circulation de l'hydroxytyrosol dans l'organisme. De plus, il a été montré que l'ingestion de tyrosol augmentait l'excrétion urinaire d'hydroxytyrosol, non pas à travers une augmentation du métabolisme de la dopamine, mais à travers une hydroxylation du tyrosol probablement à travers l'action des cytochromes P450 (Perez-Mana, Farre et al. 2015).

Par ailleurs, certains produits issus de l'oxydation de l'acide *p*-coumarique, comme le 4-hydroxybenzaldéhyde (Antolovich, Bedgood et al. 2004) ont aussi été retrouvés dans le cerveau de rats (Gasperotti, Passamonti et al. 2015). Il est intéressant de noter que tout comme le tyrosol peut être transformé en hydroxytyrosol lors des processus d'oxydation (Antolovich, Bedgood et al. 2004, Di Maio, Esposto et al. 2011, Ammar, Oturan et al. 2015), l'acide *p*-coumarique peut aussi être transformé en son équivalent *o*-diphénolique, l'acide caféique (Antolovich, Bedgood et al. 2004), qui présente une activité antioxydante supérieure (la capacité réductrice des *o*-diphénols étant supérieure à celle de leurs équivalents monophénoliques) (Cuvelier, Richard et al. 1992). Les composés présentant une structure catéchol vont réagir en formant une espèce quinonique, avec ou sans passage par une semiquinone, alors que les composés monophénoliques comme le tyrosol ou l'acide *p*-coumarique vont d'abord se transformer en radical phénoxy dans le cas d'une oxydation à un électron, ou encore peuvent réagir suivant une réaction acide-base dépendamment du radical oxydant rencontré (Fulcrand, Cheminat et al. 1992) (Dangles 2006) (Enache and Oliveira-Brett 2011). Or, la régulation de l'état rédox intracellulaire met en jeu des transferts d'électrons qui peuvent agir directement sur les composés phénoliques présents, entraînant une modification structurale des composés natifs, comme nous l'avons observé dans le chapitre 3.

La présence *in vivo* de certains métabolites issus de l'oxydation de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique ou du tyrosol laisse penser que l'activité synergique de ces trois composés phénoliques pourrait s'exercer, au moins en partie, à travers la formation de leurs métabolites dans un système biologique. De plus, *in vitro* nous avons montré que l'oxydation simultanée de ces trois composés pouvait engendrer la formation de nouveaux composés (cf chapitre 3), il est envisageable que ces processus oxydatifs aient lieu dans un système biologique soumis à une production intensive d'EROS.

En situation de stress oxydatif tel qu'observé dans la MA ou la MP, il y a une surproduction d'EROs intraneuronaux qui génère une modification de l'état rédox des cellules. Les résultats présentés dans le chapitre 2 et 3 montrent que les composés phénoliques répondent différemment aux conditions oxydatives en fonction de leur structure intrinsèque et du milieu d'observation. Or, l'association de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique potentialise leurs effets pour limiter la mort des cellules neuronales induites par le stress oxydatif. Plusieurs composés issus du métabolisme endogène de ces composés phénoliques peuvent aussi être issus de leur oxydation.

De plus, un point important à vérifier dans notre modèle d'étude est la capacité de ces composés phénoliques à passer la BHE, soit sous leur forme libre ou alors modifiés.

Hypothèse :

En mettant en parallèle les conditions oxydatives induites dans les cellules neuronales SK-N-SH et la présence des composés phénoliques étudiés, nous avons émis l'hypothèse que certains composés issus du métabolisme oxydatif des composés phénoliques pouvaient être produits à l'intérieur même des cellules neuronales et être impliqués dans les mécanismes d'actions des composés phénoliques.

Les objectifs de ce troisième axe de recherche sont d'observer les composés issus du métabolisme de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique dans notre modèle d'étude, les cellules SK-N-SH. D'autre part, nous souhaitons observer s'il existe une différence de métabolisme de ces composés en conditions basales et en conditions oxydatives et nous souhaitons déterminer si des néo composés issus de l'oxydation des composés phénoliques *in vitro* sont retrouvés dans un modèle biologique. Enfin, en utilisant un modèle d'étude de la BHE, nous avons souhaité observer si ces composés pouvaient traverser les cellules épithéliales sous leurs formes natives.

II. Méthodes

II.A. Modèle cellulaire

Afin de réaliser nos objectifs, nous avons utilisé les cellules neuronales SK-N-SH, comme dans le premier chapitre. Ces cellules adhérentes issues d'un neuroblastome et développées par J.L. Biedler et al. (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978), ont l'avantage d'exprimer un phénotype neuronal humain associé à de multiples marqueurs neuronaux. Ces caractéristiques en font un choix intéressant pour les études de neuroprotection (Ba, Pang et al. 2003).

Afin d'observer le passage des composés phénoliques à travers la BHE, nous avons utilisé un modèle de BHE en culture cellulaire. Il s'agit des cellules épithéliales de souris, les cellules Bend3, qui ont la particularité de former une monocouche de cellules liées entre elles par des jonctions serrées, comme dans le cas de la BHE (Li, Simon et al. 2010). Grâce à une culture sur inserts, nous pouvons contrôler le milieu apical et mesurer les composés dans le milieu basal (Figure 34).

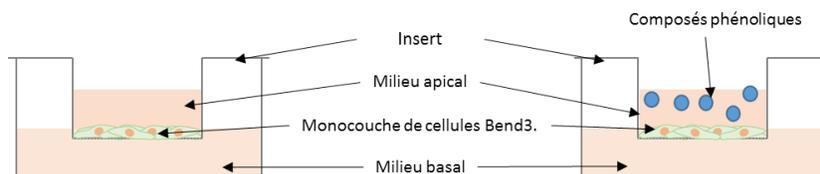


Figure 34 : Schéma de la culture des cellules Bend3 sur insert.

II.B. Traitements des cellules

Les cellules SK-N-SH ont été traitées suivant le même protocole que celui utilisé lors de la détermination de la synergie de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique dans le chapitre 2. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu EMEM supplémenté avec 10 % de FBS, 1 % de pénicilline/streptomycine et 1% de sodium pyruvate dans un incubateur à 37 °C, 5 % d'humidité et 5 % de CO₂. Le milieu de culture est remplacé une heure avant les traitements par du milieu EMEM sans sérum et sans antibiotique. Les solutions de composés phénoliques ou de H₂O₂ ont été préparées juste avant les traitements et conservées sur glace. Le mélange des trois composés phénoliques a été réalisé extemporanément.

Sept traitements ont été réalisés suivant le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Conditions de traitements des cellules SK-N-SH pour analyse des métabolites intracellulaires.

Traitements	PBS	H ₂ O ₂ 200 μM	Mix1 1 μM (Ole, Tyr, <i>p</i> -Cou) équimolarité	H ₂ O ₂ + Mix1 (Ole, Tyr, <i>p</i> -Cou) équimolarité
30 min	x	x	x	x
210 min	-	x	x	x

Pour les cellules Bend3 sur insert, les mêmes conditions de traitement ont été appliquées, à l'exception du traitement avec le peroxyde d'hydrogène. De plus, les concentrations de traitements en composés phénoliques étaient de 15 µM. Seul le milieu basal a été récolté pour analyses.

II.C. Récolte des cellules et extraction des composés phénoliques :

Récolte des cellules : Au temps t (30 min ou 210 min), le milieu de culture est prélevé et directement stocké à -20 °C. Après un rinçage au PBS froid, les cellules sont grattées avec du méthanol froid pour stopper l'activité enzymatique cellulaire. Après évaporation du solvant sous flux d'azote, l'extraction proprement dite des composés phénoliques a été réalisée par extraction liquide-solide.

Prélèvement des milieux basaux des cellules Bend3 : seul le milieu basal a été récupéré et congelé immédiatement dans de l'azote liquide.

Extraction des composés phénoliques : Le culot cellulaire sec est repris avec une solution d'extraction composée de méthanol/eau/acide phosphorique 4 % (80/18,5/1,5, v/v/v), puis centrifugé 15 min à 9000 rpm. Après récolte du surnageant, le culot est repris deux fois supplémentaires selon la même procédure. Les trois surnageants ont été regroupés et maintenus à -20 °C.

Concentrations des extraits: Afin de purifier et de concentrer les échantillons, nous avons choisi d'utiliser une méthode d'extraction sur phase solide (SPE). C'est une technique rapide et facile d'utilisation pour purifier et concentrer des échantillons. Son principe repose sur l'adsorption des composés d'intérêt sur la phase stationnaire, du rinçage de l'adsorbant, permettant d'éluer les composés de la matrice non désirables, puis la récupération des métabolites par élution avec un solvant adéquat. Le choix de l'adsorbant dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules à l'étude (polarité, solubilité, poids moléculaires ...). Il doit avoir une excellente affinité pour les composés cibles et un minimum d'affinité avec les interférents matriciels. D'après Pérez-Magariño, S. et al, les cartouches Oasis® HLB de chez Waters (Milford, MA) donnent le meilleur rendement sans provoquer aucune perte de composés phénoliques. Plusieurs études ont validé l'utilisation de ce copolymère pour l'extraction des composés phénoliques de l'huile d'olive à partir de matrices biologique (Suarez, Romero et al. 2009, Serra, Rubio et al. 2012, López de las Hazas, Piñol et al. 2016, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018). HLB est un acronyme pour "hydrophilic-lipophilic balance". La phase solide de ces cartouches en phase inverse est constituée d'un copolymère [poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)] mouillable à l'eau et aux

solvants. Compte tenu du volume de nos échantillons, nous avons utilisé des cartouches de 60 mg/3 mL.

Brièvement, la SPE se déroule en quatre étapes :

1. Activation de l'adsorbant avec 1 mL de méthanol suivi de 1 mL d'eau;
2. Dépôt de l'échantillon et rinçage du tube avec 1 mL d'eau;
3. Rinçage de l'adsorbant avec 1 mL d'eau;
4. Éluion des composés phénoliques avec deux fois 500 µL de méthanol.

Les milieux basaux récoltés des cellules Bend3 ont été directement soumis à la SPE sans traitement préalable.

Les échantillons élués ont été évaporés au SpeedVac durant 3 h, puis resolubilisés dans du méthanol 10 % et conservé à -20 °C jusqu'à analyses par LC-HRMS.

II.D. Analyses par LC-ESI-TOF-MS²

Les composés ont été séparés par chromatographie liquide grâce à un appareillage Nexera UHPLC (Shimadzu, Columbia, MD, USA) et à l'aide d'une colonne Gemini-NX (5 µm, 100 mm x 4.6 mm) en phase inverse.

Tableau 11 : Gradient utilisé pour la séparation des composés présents dans les extraits intracellulaires, avant analyses par ESI-TOF-MS².

Temps (min)	% Phase A	% Phase B
0	100	0
1.5	99	1
20	60	40
25	10	90
25.5	95	5
33	100	0

Une phase mobile A, eau / acide formique 0.1 % et une phase mobile B, ACN/acide formique 0.1 % ont été utilisées. Les solvants utilisés sont de l'acétonitrile qualité HPLC et de l'eau ultra-pure. Le gradient décrit dans le

Tableau 11 a été utilisé, avec de débit de 1.0 ml/min pour séparer 10 µl d'échantillon injecté dans le système.

L'analyse ESI-TOF-MS² a été réalisée sur un appareillage Sciex TripleTOF 5600 (triple quadrupôle-temps de vol). Les molécules ont été ionisées par électrospray (ESI) avec une source d'ion DuoSpray en mode négatif, avec une tension de pulvérisation des ions de 4 500 V, une température de 450 °C, un gaz rideau à 35 psi, les GS1 et GS2 à 50 psi et le potentiel de "declustering" à -60 V.

Les données de masse ont été mesurées entre m/z 100-1200 avec un temps d'accumulation de 350 ms et un cycle total d'une seconde. Les données .raw ont été analysées et visualisées avec les logiciels *MultiQuant 3.0.2* et *PeakView 2.2* (Sciex). Les chromatogrammes d'ions extraits (EIC

ou XIC pour « Extracted Ion Chromatogram ») pour les molécules déprotonées [M-H]⁻ ont été utilisés pour l'identification des standards d'oleuropéine, d'acide *p*-coumarique et de tyrosol ainsi que pour leur identification dans les échantillons avec une tolérance de 10 ppm.

Méthode d'identification :

Afin de répondre aux questions de recherches, deux méthodes d'analyses ont été utilisées : l'analyse ciblée et le « *suspect screening* ». La Figure 35 représente les démarches d'analyses.

II.D.a. Analyse ciblée

Afin d'identifier les composés phénoliques natifs dans les extraits cellulaires, les standards de l'oleuropéine, du tyrosol, de l'acide *p*-coumarique et du resvératrol comme standard interne, préalablement dissous dans du méthanol puis dilué avec de l'eau (final 10 %) pour arriver à une concentration de 10 µM puis mélangé ensemble (soit 2.5 µM final de chaque composé phénolique) ont été analysés par LC-ESI-TOF-MS² selon le même protocole que les échantillons. L'observation des composés phénoliques natifs dans les extraits intracellulaires a été validée par comparaison du temps de rétention, des masses exactes pour [M-H]⁻ observées, ainsi que de leur profil de fragmentation MS/MS (ANNEXE III-A-ANNEXE III-C, Figure 35 et Tableau 12)

Tableau 12 : Caractéristiques LC-ESI-TOF-MS² des composés phénoliques standards utilisés dans nos conditions.

ID	RT (min)	[M-H] ⁻	Ions produits (%)			
Acide <i>p</i> -coumarique	12,22	163,04	119,05 (77,3 %)	93,03 (7,2 %)		
Tyrosol	7,49	137,06	-			
Oleuropéine	15,23	539,17	539,18 (28,8 %)	275,08 (8,0 %)	377,12 (7,3 %)	149,02 (5,5 %)
			307,07 (5,5 %)	223,06 (3,9 %)	139,04 (3,7 %)	403,12 (1,3 %)
Resvératrol	16,96	227,07	227,07 (27,7 %)	143,05 (19,5 %)	185,06 (14,1 %)	183,08 (3,5 %)
				228,07 (3,1 %)	182,07 (2,9 %)	

II.D.b. « Suspect screening »

Dans un second temps, les données obtenues ont été confrontées à une liste de masses de types [M-H]⁻ possiblement présentes d'après la littérature et nos précédents résultats (plus particulièrement ceux obtenus dans le chapitre 3).

Afin d'observer les données LC-MS, plusieurs représentations sont possibles :

- L'observation des *Total Ion Current* (TIC) montre la somme des intensités de toutes les masses détectées sur chaque point des analyses. Dans le cas d'échantillons complexes, cette représentation fournit des observations limitées au regard du nombre d'analytes présents. En effet, les TIC de nos analyses montrent une diversité de pics difficile à analyser (ANNEXE III-B).
- La représentation en *Base Peak* (BP) se concentre sur le pic d'intensité maximale de chaque spectre et donne ainsi une vision plus claire des différences. Il s'agit donc d'une représentation du pic de l'analyte le plus intense à chaque point de l'analyse ce qui permet de limiter le bruit de fond.
- Enfin, dans la représentation *Extracted Ion Chromatogram* « XIC » un ou plusieurs m/z d'intérêts sont extraits de l'ensemble des données. L'intensité totale de ce m/z (avec une tolérance fixée à 0,02 Da) est tracée à chaque point d'analyse. Cette visualisation permet d'observer les intensités des m/z sélectionnés à chaque point et ainsi de nous focaliser sur les composés d'intérêt (ANNEXE III-C).

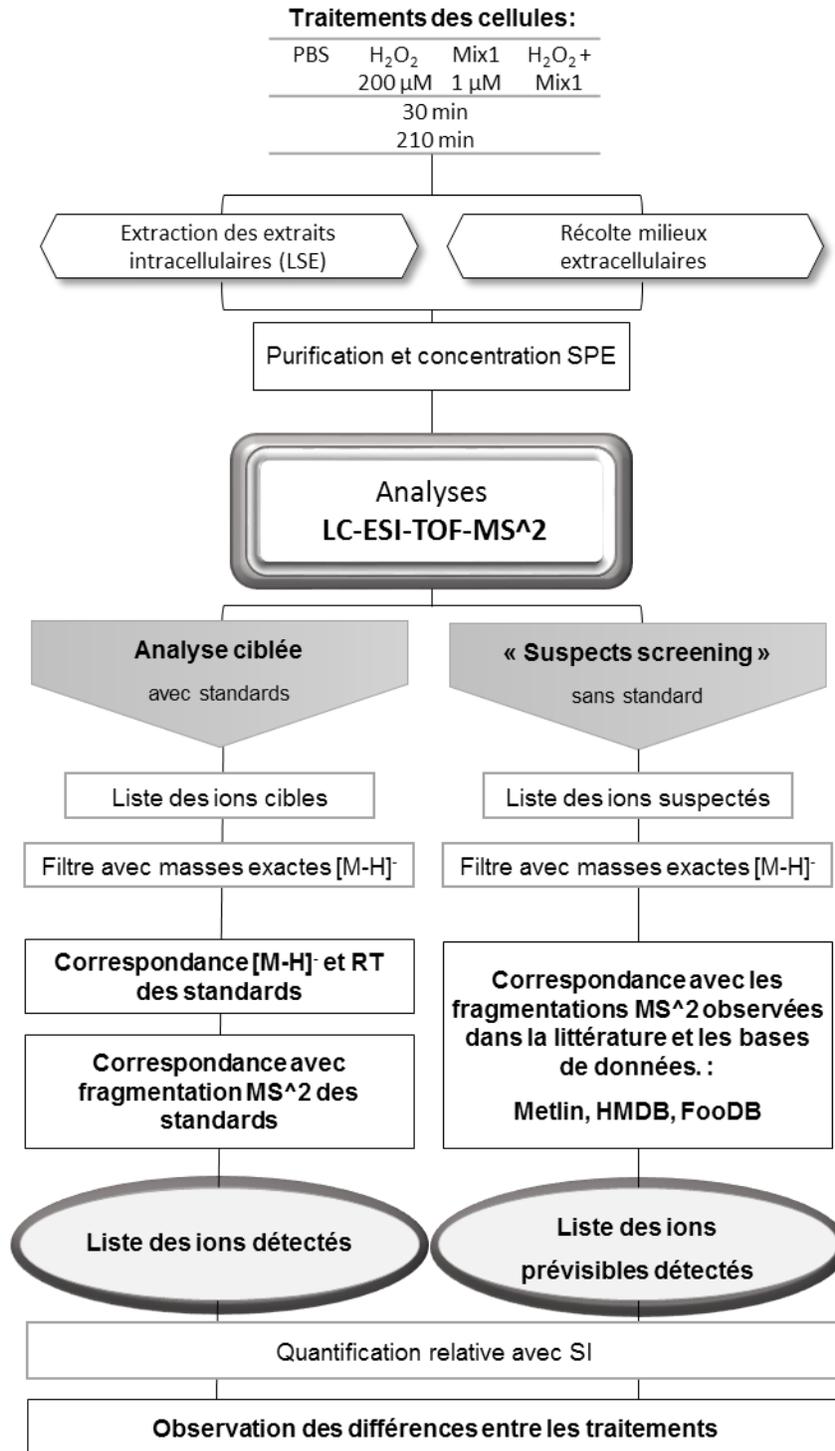


Figure 35 : Démarche d'analyse pour l'observation des métabolites intracellulaires issus de la modification présumée des composés phénoliques.

III. Analyse des Résultats et Discussion

Afin de développer cet axe de recherche, nous avons utilisé les cellules neuronales SK-N-SH issues d'un neuroblastome humain. Ces cellules ont été traitées avec le Mix1 en présence ou non de H₂O₂ durant 30 et 210 min. Après extraction et concentration, les extraits intracellulaires ont été analysés en LC- ESI-TOF-MS².

III.A. Analyse Ciblée

La recherche des masses des molécules déprotonées [M-H]⁻ correspondant aux composés standards du Mix 1 a permis d'observer si ces composés phénoliques étaient présents dans les extraits intracellulaires en fonction des conditions de traitements.

Dans un premier temps, nous avons observé que les trois composés phénoliques utilisés dans le Mix 1 étaient présents dans les extraits intracellulaires, quel que soient les conditions de traitements (Figure 36). L'oleuropéine, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique, visibles dès 30 min de traitement avec ou sans H₂O₂, sont toujours présents dans les extraits cellulaires après 210 min de traitement avec ou sans H₂O₂. Cette observation démontre une internalisation rapide des trois composés phénoliques par les cellules SK-N-SH, telle que déjà montrée dans l'article 1, et sans modification de leur structure initiale pendant au moins 210 min, que les cellules soient soumises à un stress oxydatif ou non.

Cette observation permet de valider une action intracellulaire de ces composés et soutient l'hypothèse d'un potentiel synergique de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique, puisqu'ils sont présents ensemble dans les cellules neuronales.

Dans un second temps, l'analyse des intensités entre les différents échantillons amène d'autres informations. Les intensités et les aires du pic du standard interne (le resvératrol) sont toutes équivalentes entre les échantillons (moyenne aire SI = 5908400; SD = 565082). L'étape de purification-concentration des échantillons a donc été équivalente entre tous les échantillons, ainsi que la séparation LC et l'analyse MS. Cette similarité est indispensable à l'élaboration des ratios

$$\frac{\text{Aire pic } m/z \text{ d'intérêt}}{\text{Aire pic } m/z \text{ SI}}$$

afin d'apprécier une quantification relative des ions observés en fonction des échantillons et donc des traitements infligés aux cellules.

Contrairement au standard interne, les intensités et les aires des pics relatifs aux composés phénoliques administrés ne sont pas équivalentes entre les échantillons. Les quatre échantillons issus de l'expérimentation n°1 (n1) sont plus élevés en ce qui concerne le tyrosol. Pour l'acide *p*-coumarique, seul l'échantillon Intra_mix_30min_n1 présente une aire plus importante. Enfin, l'échantillon Intra_mix_210min_n1 présente une intensité beaucoup plus élevée pour le *m/z* 539.1777 correspondant à la molécule déprotonée [M-H]⁻ de l'oleuropéine. Ces différences d'intensités pour les composés phénoliques natifs sont confirmées par les SEM importants de la quantification relative (Figure 36). Cette forte variabilité inter-échantillon ne permet pas de dégager une tendance significative quant à la quantité relative des composés phénoliques natifs présents en intracellulaire en fonction des traitements des cellules neuronales.

Afin de déterminer si la totalité des composés phénoliques du Mix1 ont été internalisés par les cellules, nous avons analysé les milieux extracellulaires. Les masses [M-H]⁻ du tyrosol et de l'acide

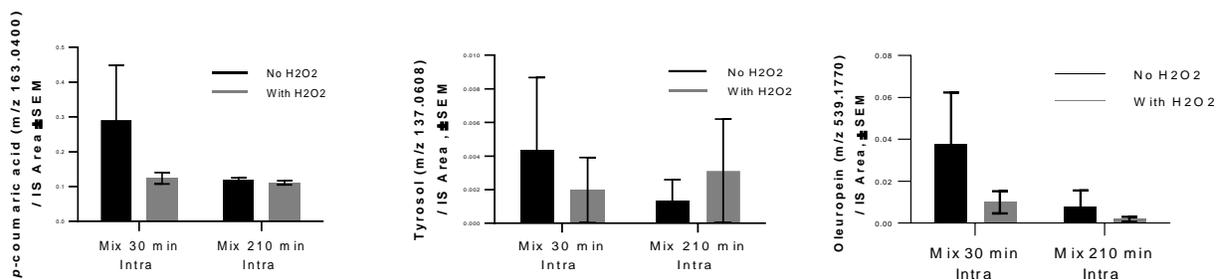


Figure 36 : Analyse de la quantité relative des composés phénoliques natifs dans les extraits intracellulaires.

p-coumarique sont observée, mais pas celle de l'oleuropéine. Soit cette dernière a été totalement absorbée par les cellules, soit elle s'est dégradée dans le milieu de culture durant le processus de concentration des milieux. Étrangement, le resvératrol, notre standard interne, n'est pas non plus visible dans les analyses des milieux extracellulaires. Lors des SPE ayant pour objectif de concentrer les composés phénoliques présents dans les milieux de culture, les conditions de rinçages étaient légèrement différentes de celles utilisées pour les extraits intracellulaires du fait du grand volume (10 ml) de milieu. Cette différence ne nous permet pas de comparer les quantités relatives des composés phénoliques entre les extraits intracellulaires et les milieux extracellulaires, et peut expliquer l'absence du resvératrol et de l'oleuropéine. En effet, les milieux de culture ont été rincés avec deux fois 4 ml d'eau, ce qui aurait pu entraîner une élution du

resvératrol et/ou de l'oleuropéine, et par conséquent leur perte. L'analyse « *suspect screening* » pourrait nous donner de plus amples informations sur une dégradation éventuelle de l'oleuropéine dans les milieux extracellulaires.

L'observation des aires relatives correspondantes au tyrosol et à l'acide *p*-coumarique dans les milieux extracellulaires appuie la grande variabilité inter-échantillon déjà observée pour les extraits intracellulaires et ne permet pas d'observer de différence significative entre les différents temps de traitements.

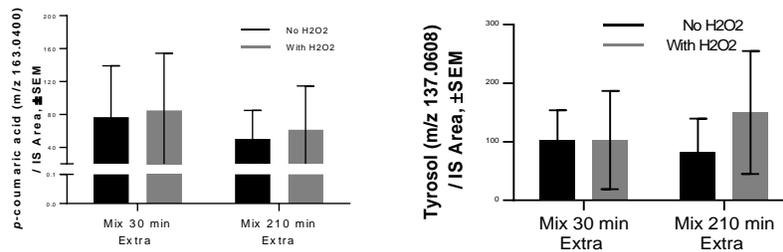


Figure 37 : Analyse de la quantité relative des composés phénoliques natifs dans les milieux extracellulaires.

Cette analyse ciblée montre que l'oleuropéine, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique sont internalisés par les cellules SK-N-SH dès 30 min même en conditions de stress cellulaire. De plus ces composés phénoliques sont toujours détectables après 210 min de traitements ce qui suggère une stabilité intracellulaire et une métabolisation faible dans le temps de nos analyses. Cette stabilité de l'oleuropéine déjà été mis en avant dans les cellules SKBR3, une lignée cellulaire de cancer du sein, où plusieurs composés phénoliques ont été retrouvés dans les extraits intracellulaires dès 15 min de traitement, et jusqu'à 48h pour l'oleuropéine, après exposition à un extrait de feuille d'olivier (Quirantes-Piné, Zurek et al. 2013).

L'application de la seconde méthode d'analyse des données peut donner plus d'informations concernant la métabolisation et le devenir de ces composés phénoliques.

III.B. « Suspect screening »

La littérature fait état de plusieurs types de métabolites retrouvés après administration des composés phénoliques de l'huile d'olive dans le plasma et/ou les urines chez les humains, ainsi que dans divers organes chez les animaux. Certains métabolites ont aussi été observés dans plusieurs types cellulaires. L'état des lieux de la littérature concernant les différents composés

phénoliques retrouvés après administration d'huile d'olive, d'hydroxytyrosol, d'oleuropéine ou encore de mélange de composés phénoliques est résumé dans les tableaux 11, 12 et 13.

Par ailleurs, dans le chapitre 3, nous avons axé nos recherches sur l'observation des métabolites issus d'un mécanisme oxydatif de l'oleuropéine, du tyrosol ou de l'acide *p*-coumarique. Comme exposé précédemment, les études démontrent l'existence de plusieurs métabolites dépendamment de la méthode d'oxydation employée, bien que certains puissent être communs aux différents processus d'oxydation mis en jeu (Tableau 19 à 22, Annexe I).

Afin d'observer les éventuelles modifications métaboliques de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique, les données HRMS ont été confrontées à une liste de masses [M-H]⁻ des composés phénoliques étudiés ayant subi des modifications enzymatiques de phase II (Tableau 13 : Listes des composés phénoliques ayant subi des modifications de phase II recherchées.), puis aux masses [M-H]⁻ des métabolites retrouvés dans les cerveaux d'animaux après administration de ces composés ou d'une matrice contenant ces composés phénoliques natifs (Tableau 14). Enfin, l'ensemble des molécules déprotonées [M-H]⁻ des métabolites retrouvés dans les systèmes biologiques ont été recherchées (Tableau 15).

Dans un second temps, les données ont été confrontées aux analyses de métabolites issus des mécanismes oxydatifs retrouvés dans notre étude du chapitre 3 (Tableau 16) ainsi que dans les études *in vitro* précédentes.

Dans la mesure où nous ne disposons pas de standards pour ces différents composés, pour chaque molécule déprotonée [M-H]⁻ recherchée, la comparaison des *m/z* présents dans les analyses a été effectuée avec les *m/z* correspondants dans les bases de données (BDD) METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) et FoodDB (<http://foodb.ca/>), avec une tolérance de 30 ppm. De plus, la comparaison des spectres de fragmentation MS² avec la littérature disponible et les BDD, toujours avec une tolérance de 30 ppm a permis, ou non, les validations des masses retrouvées dans nos analyses.

III.B.a. Screening des molécules déprotonées [M-H]⁻ avec modifications enzymatiques de phase 2

Aucune masse de type [M-H]⁻ relative aux métabolites issus des modifications enzymatiques de phase II (Tableau 11) n'a été retrouvée dans les extraits intracellulaires. Seule une masse [M-H]⁻ « suspectée » a été retrouvée avec certitude dans les milieux extracellulaires des expérimentations n1. Il s'agit du pic à *m/z* 217,0182 et éluant à 9,70 min, correspondant au tyrosol

sulfate, avec une erreur de 2 ppm dans la BDD Metlin (ANNEXE III-F). Son spectre de fragmentation montre les fragments m/z 80,9638 et 137,0639, similaires à ceux observés dans la BDD HMDB. De plus, le fragment m/z 137,0639 correspond à une perte du groupement sulfate (masse exacte de 79,9568 Da), ce qui confirme l'identité de cet ion.

Bien que l'aire correspondant à l'échantillon n1 traité à 210 minutes avec le Mix1 en présence de H_2O_2 semble plus élevée que dans les autres conditions (Figure 39), l'absence de détection de ce métabolite dans les autres échantillons traités avec la Mix1 ne nous permet pas de tirer de conclusion sur la quantité relative du tyrosol sulfate en fonction des traitements. Cependant, ce résultat confirme qu'il existe une métabolisation des composés phénoliques dans les cellules SK-N-SH.

La sulfatation des composés phénoliques est induite par un processus enzymatique faisant intervenir les sulfotransférases endogènes. Le tyrosol sulfate a été retrouvé dans le foie et les reins chez les rats après ingestion d'huile d'olive (Serra, Rubio et al. 2012), mais aussi dans les lipoprotéines de faible densité (LDL) circulant dans le plasma (de la Torre-Carbot, Chavez-Servin et al. 2007). Jusqu'à présent, il n'a pas été décrit dans les cerveaux d'animaux ou dans d'autres types de cellules neuronales. La caractérisation des différentes sulfotransférases dans les cellules SK-N-SH n'est pas très bien établie. Cependant, elles ont été mesurées dans les cellules sous-clones des SK-N-SH, les SH-SY5Y. L'atlas des protéines humaines (Human Protein Atlas : <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/cell>) décrit la présence des SULT2A1; 1A3, 1A1, 1A4, 1A2, 1B1 et 1C4 dans ces cellules. On peut supposer qu'au moins l'une d'entre elles est active sur le tyrosol.

L'absence d'autres masses $[M-H]^-$ correspondant à des modifications enzymatiques de phase II supporte l'idée que soit les cellules SK-N-SH n'ont pas été en mesure de glucuronider ou de méthyler ces composés phénoliques (malgré la présence d'une enzyme COMT fonctionnelle dans les SK-N-SH (Ogburn, Bottiglieri et al. 2006)), soit ils ont été transformés en d'autres dérivés.

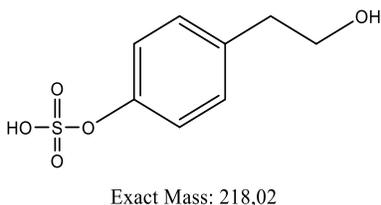


Figure 38 : Structure du Tyrosol Sulfate.

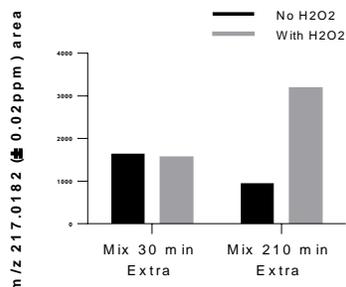


Figure 39 : Aire du pic relatif à l'ion m/z 217.0182 retrouvé dans les milieux extracellulaires des expérimentations n1 traitées avec le Mix1.

Tableau 13 : Listes des composés phénoliques ayant subi des modifications de phase II recherchées.

Composés	Formules	Modifications	Masse Exacte	[M-H] ⁻	
Tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂		138,06	137,06	
		methyl	+ CH ₃ - H	152,08	151,07
		sulfate	+ SO ₃ - H	218,02	217,01
	glucuronide	+ C ₆ H ₁₀ O ₇ - H ₂ O	314,10	313,09	
Acide <i>p</i> -coumarique	C ₉ H ₈ O ₃		164,04	163,03	
		methyl	+ CH ₃ - H	178,06	177,05
		sulfate	+ SO ₃ - H	244,00	242,99
	glucuronide	+ C ₆ H ₁₀ O ₇ - H ₂ O	340,07	339,07	
Oleuropéine	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃		540,18	539,17	
		methyl	+ CH ₃ - H	554,19	553,19
		sulfate	+ SO ₃ - H	620,14	619,13
	glucuronide	+ C ₆ H ₁₀ O ₇ - H ₂ O	716,21	715,20	

III.B.b. Screening des molécules déprotonées [M-H]⁻ retrouvées dans les cerveaux d'animaux :

Les cellules SK-N-SH présentent un phénotype neuronal et expriment plusieurs marqueurs neurochimiques (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978). Il est donc probable de retrouver des dérivés des composés phénoliques étudiés similaires à ceux qui ont été préalablement observés dans le cerveau d'animaux.

La comparaison avec les masses de type [M-H]⁻ correspondants à ces différents métabolites par rapport à ceux retrouvés dans nos échantillons fait ressortir un m/z 153,0561 retrouvé à un RT 7,54 min (Annexe III-E) dans les extraits intracellulaires. Ce composé correspond à l'hydroxytyrosol. Cependant, il est retrouvé uniquement dans l'expérimentation n1. Sa faible intensité n'a pas permis d'obtenir son spectre de fragmentation, mais la recherche du m/z

153,0561 dans la base de données Metlin donne une similarité avec la m/z de l'OH-Tyr avec une variation de 2 ppm.

La molécule déprotonée $[M-H]^-$ correspondant à l'hydroxytyrosol est détectée dans les milieux extracellulaires de toutes les expérimentations au même RT, bien que majoritaire dans les extractions n1. Pour ces échantillons, la fragmentation du m/z 153.0561 a été possible et donne des fragments m/z 123,0455; 64,9447; 41,0022; 44,9970; 108,9360 caractéristiques de la fragmentation de l'OH-Tyr (d'après la BDD Metlin).

La détection d'hydroxytyrosol après administration orale d'oleuropéine a été démontrée à plusieurs reprises, notamment dans l'urine chez les humains (Vissers, Zock et al. 2002) et chez les rats (López de las Hazas, Piñol et al. 2016), dans le plasma de rats (Bazoti, Gikas et al. 2010) et plus particulièrement dans les cerveaux de rats après 21 jours de supplémentation avec 5 mg d'oleuropéine /kg de poids corporel (López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018). Lopez de la Hazas et al. ont retrouvé jusqu'à 700 ng d'hydroxytyrosol par gramme de cerveaux frais, soit 1,5 fois plus que dans les cerveaux contrôles n'ayant pas reçus d'oleuropéine (les animaux ayant été sacrifié par exsanguination puis perfusé avec du NaCl pendant 8 min, aucune contamination sanguine n'a pu fausser leurs estimations). Il est judicieux de rappeler ici que plusieurs métabolites suspectés de l'oleuropéine sont aussi présents de manière endogène suite au métabolisme de la dopamine. C'est notamment le cas de l'hydroxytyrosol.

Dans notre étude, l'absence de la masse correspondant à l'hydroxytyrosol déprotonné $[M-H]^-$ dans les extraits cellulaires n'ayant pas été traités avec le Mix1 confirme que l'hydroxytyrosol détecté est bien issu de l'hydrolyse de l'oleuropéine. Cependant, l'absence de détection de cet ion dans les extraits intracellulaires n2 et n3, ainsi que la variabilité inter-échantillons observée dans les milieux extracellulaires n'a pas permis d'observer une différence significative entre les différents traitements. La détection de ce métabolite de l'oleuropéine, suspecté majoritaire, uniquement dans une des trois expérimentations soulève un problème expérimental soit au niveau du traitement des cellules, soit au niveau du processus d'extraction et de purification des échantillons intracellulaires. La détection de l'hydroxytyrosol dans les milieux extracellulaires supporte plus une mauvaise extraction-purification de ces échantillons. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi aucun composé issu du métabolisme de la dopamine n'est visible ni dans les cellules traitées avec le Mix1, ni dans les cellules contrôles. En effet, les cellules SK-N-SH sont des cellules dopaminergiques qui devraient excréter des sous-produits de la dopamine (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978, Richards and Sadee 1986).

Par ailleurs, l'hydroxytyrosol sulfate n'est pas détecté, alors que la sulfatation du tyrosol a été observée. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude récente établie sur les cellules SH-SY5Y,

une lignée sous-clone de la lignée SK-N-SH. Cette étude n'a pas été en mesure d'observer d'hydroxytyrosol sulfaté après exposition des cellules SH-SY5Y avec de l'hydroxytyrosol (López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018). Une première hypothèse pourrait être soit une trop faible quantité de ce métabolite pour être détecté, soit une absence de sulfatation de l'hydroxytyrosol, ou encore un processus de purification non adéquat.

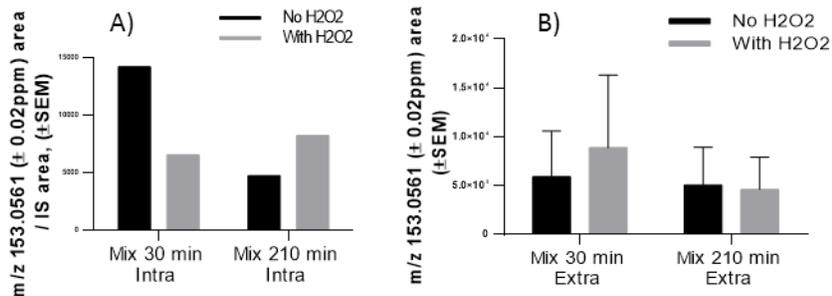


Figure 40 : Analyse de la quantité relative de l'ion m/z 153.0561 retrouvé dans les échantillons traités avec le Mix1 :
 A) dans les extraits intracellulaires de l'expérimentation n1; B) dans les milieux extracellulaires de tous les échantillons.

Tableau 14 : Listes des masses des composés phénoliques retrouvés dans les cerveaux animaux.

D'après D'Angelo et al 2001, Lopez de las hazas 2018, serra 2012.

Composés	Formules	Exact Mass	[M-H] ⁻
Acide Homovanillique	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,05	181,05
Acide Homovanillique sulfate	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	262,01	261,00
Acide vanillique	C ₈ H ₈ O ₄	168,04	167,03
Dérivés d'oleuropéine	-		
DOPAC (Acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique)	C ₈ H ₈ O ₄	168,04	167,03
DOPAL (3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde)	C ₈ H ₈ O ₃	152,04	151,03
Enterolactone sulfate	C ₁₈ H ₁₈ O ₇ S	378,07	377,06
Homovanilline	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,06	165,05
Hydroxytyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₃	154,06	153,05
Hydroxytyrosol Acetate (3,4-DHPEA-Ac)	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196,07	195,06
Hydroxytyrosol Acetate Sulfate (3,4-DHPEA-Ac-S)	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S	276,03	275,02
Hydroxytyrosol Glucuronide	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	342,09	341,08
Hydroxytyrosol sulfate	C ₈ H ₁₀ O ₆ S	234,01	233,01

III.B.c. Screening des molécules déprotonées [M-H]⁻ retrouvées les systèmes biologiques :

Les résultats de la recherche des métabolites dérivés de l'oleuropéine, du tyrosol ou de l'acide *p*-coumarique ont fait ressortir le composé m/z 403,1241, au RT 9,33 min (ANNEXE III-D). Cet ion est retrouvé dans tous les échantillons intracellulaires ayant été traités avec les composés

phénoliques avec une erreur en moyenne inférieure à 0,085 ppm (en valeur absolue). Avec une tolérance de 3 ppm dans la BDD Metlin, il correspond au 11-méthyl-oléoside (ou 11-méthyl ester oléoside). Certains fragments issus de la fragmentation de ce composé sont communs aux rapports de masses sur charges correspondants à la fragmentation du 11-méthyl-oléoside dans la BDD HMDB : c'est le cas des fragments m/z 59,0126; 71,0131; 139,0904; 179,0557; 223,0629. La validation de l'identité de ce composé peut être établie, d'autant plus qu'il s'agit d'un produit issu de l'hydrolyse de la liaison ester de l'oleuropéine. Cette hydrolyse est connue dans les processus de maturation de l'huile d'olive. Elle peut être induite par les estérases endogènes (Ramírez, Brenes et al. 2016) ou encore par des facteurs tels que l'exposition à l'air, la lumière, les acides, les bases, des oxydants ou des ions métalliques (Yuan, Wang et al. 2015). Le résultat de cette hydrolyse est l'apparition du 11-méthyl-oléoside (Figure 41). Figure 41 : Hydrolyse de la liaison ester de l'oleuropéine pour former le 11-méthyl oléoside. Sa quantité relative est donc dépendante de la quantité relative d'oleuropéine. Cependant, la comparaison des quantités relatives de l'oleuropéine et du 11-méthyl-oléoside ne permet pas de dégager de différence significative d'apparition du composé issu de l'oleuropéine en fonction du temps ou des conditions oxydatives (Figure 43).

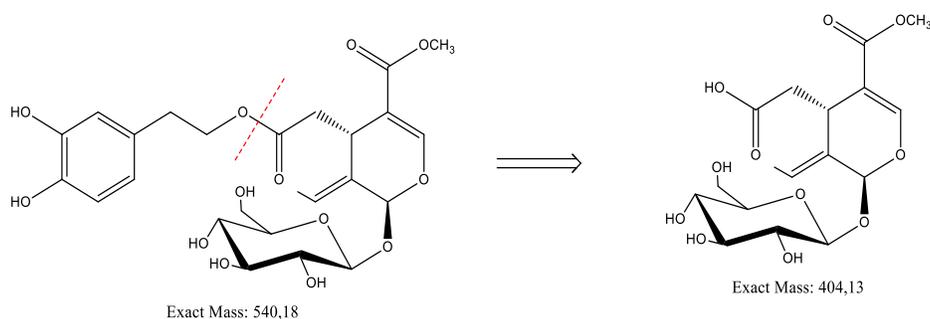


Figure 41 : Hydrolyse de la liaison ester de l'oleuropéine pour former le 11-méthyl oléoside.

Ce composé est aussi détecté dans les milieux extracellulaires. Sa présence peut être due à deux cas de figure : la dégradation de l'oleuropéine dans le milieu durant le temps de traitements ou l'hydrolyse de l'oleuropéine par des estérases intracellulaires suivi d'une excrétion de 11-méthyl-oléoside à l'extérieur des cellules. Dans l'étude du chapitre 2, il a été observé une dégradation de l'oleuropéine à travers l'observation du m/z 403.12 dans les solutions laissées à température ambiante pendant 24h. De plus ce composé avait été détecté dans les échantillons d'oleuropéine référence dans l'article 2, qui n'a donc pas été soumis à une oxydation, indiquant qu'il n'est pas un marqueur fiable de l'oxydation lors de l'analyse par LC-MS. Afin de répondre à cette question,

nous avons effectué des contrôles en analysant la dégradation des composés phénoliques incubés dans les conditions de cultures cellulaires en l'absence de cellules. Nous avons observé que le tyrosol et l'acide *p*-coumarique étaient retrouvés non modifiés après 210 min d'incubation. De plus, l'oleuropéine native a aussi été retrouvée sous forme native, mais aussi son produit d'hydrolyse, le 11-méthyle-oléoside. On peut donc déduire que la totalité de ce composé retrouvé dans les milieux extracellulaires de nos échantillons n'est pas due à une dégradation induite par les cellules, mais plutôt à une dégradation de l'oleuropéine induite par l'incubation.

Dans la littérature portant sur les métabolites *in-vivo* ou *in-cellulo* de ces composés (Tableau 15), seule une étude fait état de la présence du 11-méthyl-oléoside dans les extraits d'une lignée cellulaire de cancer du sein (cellules SKBR3), dès 15 min après exposition avec un extrait de feuille d'olivier contenant plusieurs composés phénoliques, dont deux isomères du 11-méthyl-oléoside (Quirantes-Piné, Zurek et al. 2013). Cette dernière observation permet de valider que le 11-méthyl-oléoside peut être internalisé par des cellules, mais laisse ouverte l'hypothèse d'une internalisation de l'oleuropéine suivie d'une hydrolyse interne ou d'une hydrolyse dans le milieu suivi d'une internalisation.

La quantification semi-relative de cet ion dans les extraits intracellulaires et la comparaison des moyennes des aires pour les milieux extracellulaires ne permettent pas d'observer de différence significative entre les différentes conditions dues à une forte variabilité inter échantillons.

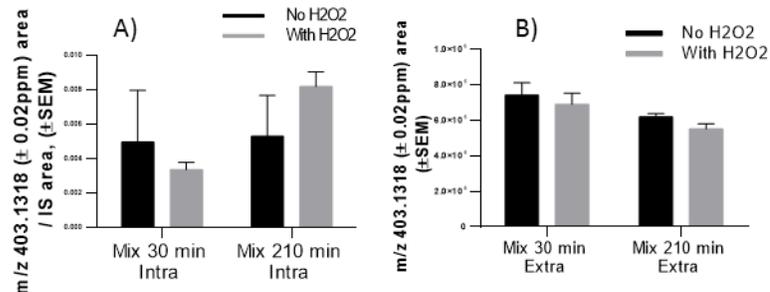


Figure 42 : Analyse de la quantité relative de l'ion m/z 403.1318 retrouvé dans les échantillons traités avec le Mix1 : A) dans les extraits intracellulaires; B) dans les milieux extracellulaires.

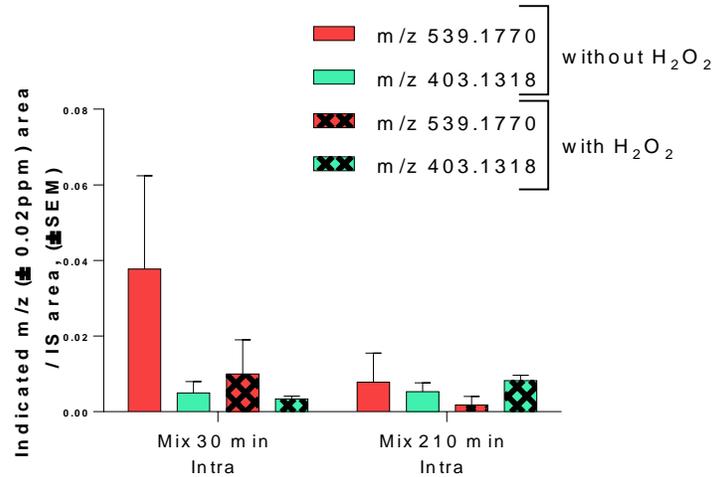


Figure 43 : Comparaison de la quantité relative de l'oleuropeine (m/z 539.1770) et du 11-méthyl-oléoside (m/z 403.1318) dans les extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitements.

Aucune autre masse $[M-H]^-$ correspondant à des métabolites précédemment retrouvés dans les systèmes biologiques n'a pu être détectée dans nos conditions d'analyses.

Il est important de souligner que la plupart des métabolites retrouvés dans les cerveaux d'animaux ou dans d'autres organes et fluides issus d'organismes vivants ont été observés après administrations orales ou intraveineuses. Ces moyens d'administration des composés phénoliques, seuls ou présents dans des extraits végétaux, entraînent un passage par le système digestif et par la circulation sanguine. Il en résulte que la transformation des composés phénoliques natifs en leurs métabolites peut avoir lieu dans différents compartiments biologiques (Visioli, Galli et al. 2000, Vissers, Zock et al. 2002) à travers des systèmes enzymatiques qui peuvent être inefficaces ou absents dans les cellules utilisées dans cette étude.

Tableau 15 : Listes des masses des composés phénoliques retrouvés dans les systèmes biologiques autres que dans le cerveau d'animaux.

Composés	Formules	Exact Mass	[M-H] ⁻
10-Hydroxy-10-méthyle Oleuropéine aglycone	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	408,14	407,13
3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) + H ₂ + glucuronide	C ₂₅ H ₃₁ O ₁₄	555,17	554,16
3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) + H ₂ O + glucuronide	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅	572,17	571,16
3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) + HO + glucuronide	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₅	570,15	569,15
3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) + OH	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	394,12	393,11
3,4-DHPEA-EA (oleuropéine aglycone) + OH + Sulfate	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₂ S	474,08	473,07
3,4-DHPEA-EDA (oléacéine) + glucuronide	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496,15	495,15
3,4-DHPEA-EDA (oléacéine) + H ₂ + glucuronide	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	556,17	555,17
3,4-DHPEA-EDA (oléacéine)	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	320,12	319,11
Déméthyloleuropéine	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	526,16	525,16
Acide élénolique	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	242,07	241,07
Acide élénolique Sulfate	C ₁₁ H ₁₄ O ₉ S	322,03	321,02
Férulique acide	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,05	193,05
Méthyl 3,4-DHPEA-EDA + glucuronide	C ₂₄ H ₂₉ O ₁₂	509,16	508,15
Oléocanthal	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	304,13	303,12
Oléoside-11-méthylester	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404,13	403,12
Oleuropéine aglycone	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	378,13	377,12
Oleuropéine di-glucoside	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	702,23	701,22
p-HPEA-EA (ligostroside aglycone) glucuronide	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	524,18	523,18
p-HPEA-EA (ligstroside aglycone)	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	362,13	361,12
p-HPEA-EDA (ligstroside aglycone dialdehyde)	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	304,13	303,12
p-HPEA-EDA + glucuronide	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	496,15	495,15
p-HPEA-EDA + H ₂ + glucuronide	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	540,18	539,17
p-HPEA-EDA + H ₂ O	C ₁₇ H ₂₂ O ₆	322,14	321,13
Sécologanoside	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390,11	389,10
Tyrosol acétate	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,07	179,07

III.B.d. Screening des molécules déprotonées [M-H]⁻ issus de l'oxydation des composés phénoliques :

Dans la mesure où au moins une partie des composés phénoliques du Mix1 sont retrouvés intacts dans les extraits intracellulaires des SK-N-SH, l'hypothèse d'une oxydation de ces composés par les EROs présents dans les cellules en situation de stress oxydatif est renforcée. D'autant plus que certains produits issus de l'oxydation de l'hydroxytyrosol, comme le DOPAC (acide 3,4-dihydroxyphénylacétique) obtenu par la réaction de Fenton (III.B.a, p.192, Tableau 14)(Di Maio, Esposito et al. 2011), sont aussi des composés issus de la dégradation de la dopamine.

Les données HRMS ont donc été confrontées aux métabolites issus de l'électro-oxydation des composés phénoliques observés dans le chapitre 3, ainsi qu'aux métabolites évoqués dans la littérature, issus de diverses méthodes d'oxydation (Tableau 16 et Tableau 20 - Tableau 24 Annexe I).

Cependant, aucun ion relatif aux ions observés après oxydation des composés phénoliques à l'électrode ou par d'autres méthodes d'oxydation décrites dans la littérature n'a pu être observé.

Plusieurs causes peuvent expliquer l'absence de ces composés dans les extraits intracellulaires des SK-N-SH. Premièrement, il est possible que les produits issus de l'oxydation de ces composés n'apparaissent pas ou très faiblement dans le modèle biologique utilisé étant donné la diversité des espèces intracellulaires et la rapidité des réactions impliquées dans les processus réactionnels des radicaux de types phénoxyles, des semiquinones et quinones formées suite à l'oxydation des composés phénoliques (Enache and Oliveira-Brett 2011, Mathew, Abraham et al. 2015, Umeno, Takashima et al. 2015). Ces intermédiaires réactionnels électrophiles sont connus pour réagir avec des composés réducteurs intracellulaires, notamment avec l'eau, les acides aminés ou les composés possédant un groupement thiol (Monks and Lau 1997, Satoh and Lipton 2007, Lipton, Rezaie et al. 2016, Parvez, Long et al. 2018), ce qui empêcherait la formation de composés issus de l'oxydation tel qu'observés *in vitro*.

Cependant, l'absence des masses déprotonées des métabolites issus de la dopamine, notamment du DOPAC indiquent plus probablement une incapacité de détection des métabolites phénoliques produits en faible quantité dans nos conditions expérimentales. L'observation des composés sous leurs formes natives même après 210 min de traitement en conditions oxydatives laisse penser que seule une faible proportion de composés phénoliques a pu réagir dans les cellules et que notre méthode d'extraction n'a pas permis leur observation.

Tableau 16 : Produits issus de l'électrolyse des composés phénoliques individuels et du Mix 1
(voir chapitre 3).

	Formule présumée	Masse Exacte	m/z
Ac. <i>p</i>-coumarique			
I Iso – ac. <i>p</i> -coumarique (<i>m</i> - ou <i>o</i> -)	C ₉ H ₈ O ₃	164	163
I unknown	-	-	497
E Dimère ac. <i>p</i> -coumarique	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	326	325
G Dimère ac. <i>p</i> -coumarique décarboxylé		282	281
Tyrosol			
Tyrosol dimère	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	274	273
Tyrosol Trimère	C ₂₄ H ₂₆ O ₆	410	409
Oxidized tetramère	C ₃₂ H ₃₄ O ₈	546	545
Oleuropein			
B Hydroxytyrosol Quinone Hydratée	C ₈ H ₈ O ₃ + H ₂ O	170	169
O3 11-méthyl-oléoside	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	404	403
O4 unknown	-	-	587
O4 unknown	-	-	573
A 10- Hydroxyoleuropeine			555
O5 unknown	-	-	585
O6 unknown	-	-	615
O7 unknown	-	-	617
unknown	-	-	431
unknown	-	-	567
unknown	-	-	461
O8 unknown	-	-	553
Dimère d'oleuropeine	C ₅₁ H ₆₆ O ₂₅	1078	1 077
D unknown	-	-	1 091
unknown	-	-	581
O9 unknown	-	-	584
m/z spécifiques du Mix1			
[Tyr - <i>p</i> -Cou -2H-H] ⁻			299
[Tyr - <i>p</i> -Cou -2H-H] ⁻ isomère	-	-	299
[Tyr - Ole -2H-H] ⁻			675
unknown	-	-	1 195
unknown	-	-	325

III.C. Analyse des milieux basaux des cellules Bend3

Afin d'observer si les composés phénoliques pouvaient traverser un modèle de BHE sous leurs formes natives, nous avons utilisé les cellules Bend3 cultivées sur inserts et avons analysé le milieu basal après 30 et 210 min de traitement en LC-ESI-TOF-MS². La recherche des formes natives des composés phénoliques du Mix 1 s'est réalisée par comparaison avec les standards. Que ce soit pour l'oleuropeine, le tyrosol ou l'acide *p*-coumarique, nous retrouvons les composés natifs dans le milieu basal des cellules dès 30 min de traitements (Figure 44). Ce qui confirme le passage de ces composés phénoliques à travers ce modèle de BHE. Par ailleurs, nous remarquons une augmentation de la quantité semi-relative des composés phénoliques après 210 min de traitement. Cette expérience préliminaire n'a jusqu'à présent été réalisée qu'une seule fois et demande à être répétée pour connaître la significativité de ces analyses, mais suggère un passage aisé des cellules épithéliales. Le passage des composés phénoliques à travers la BBB

n'est pas totalement élucidé et pourrait faire intervenir un transport passif pour les monophénols (Figueira, Garcia et al. 2017), ainsi qu'un transport actif pour l'oleuropéine à travers les récepteurs au glucose (Youdim, Dobbie et al. 2003). Nos expérimentations actuelles ne permettent pas d'émettre d'hypothèse quant au mode de transport de ces composés dans nos conditions.

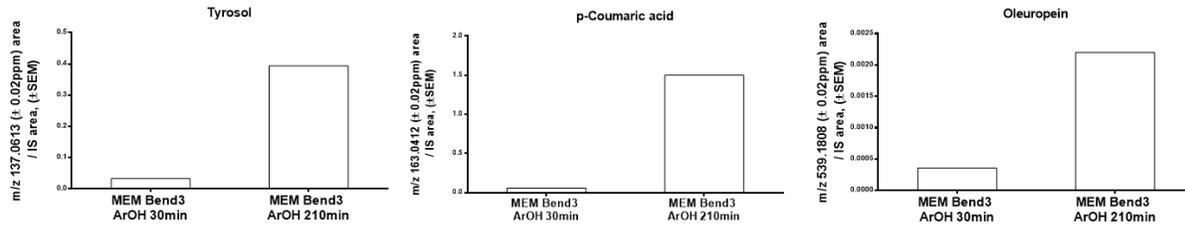


Figure 44 : Évaluation semi-quantitative des formes natives des composés phénoliques étudiés dans le milieu basal des cellules Bend3 après 30 et 210 min de traitement.

Les cellules cultivées sur inserts ont été traitées avec 15 μ M du Mix 1.

IV. Conclusion

Ces expériences préliminaires sur la recherche des métabolites des composés phénoliques composant le Mix1 (oleuropéine, tyrosol et acide *p*-coumarique) montrent que ces composés sont internalisés dans les cellules SK-N-SH dès 30 min de traitement même en conditions oxydatives. De plus, une stabilité pendant au moins 210 min a pu être observée, ce qui suggère un effet biologique potentiel de cinétique longue. Cette observation s'accorde avec de précédentes études qui ont démontré une accumulation des composés phénoliques dans le temps. En effet, certains polyphénols comme les isoflavones ou les flavonoïdes s'accumulent dans le cerveau *in vivo* après plusieurs semaines de supplémentation (Kwon, Kim et al. 2001, Kalt, Blumberg et al. 2008, Milbury and Kalt 2010). De plus, l'accumulation de tyrosol a déjà été observée dans les cellules de macrophages (de macrophages J774A.1), passant de 0.68 ng/mg de protéines après 5 min d'exposition et à 1.72 ng/mg de protéines après 18h d'exposition (Di Benedetto, Vari et al. 2007). L'accumulation d'acides phénoliques dans le cerveau de modèles animaux a aussi été décrite à plusieurs reprises (Szwajgier, Borowiec et al. 2017), et l'acide *p*-coumarique a été retrouvé dans le cerveau de souris (Gasperotti, Masuero et al. 2014, Gasperotti, Passamonti et al. 2015). Concernant l'oleuropéine, à notre connaissance, c'est la première fois qu'une accumulation de sa forme native est observée dans un type cellulaire neuronal. Seuls des dérivés de l'oleuropéine ont déjà pu être observés dans les cerveaux de rats entre 1 h et 4 h après gavage (Serra, Rubio et al. 2012).

Malgré cette apparente stabilité, les produits majeurs de dégradation de l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol ainsi que le 11-méthyl-oléoside, ont été observés. Il semble donc y avoir d'un côté un métabolisme cellulaire de l'oleuropéine, mais aussi une dégradation partielle dans le milieu de culture. L'absence des composés issus de l'oxydation *in vitro* de ces composés phénoliques ne permet pas d'affirmer que ces composés interviennent à l'échelle cellulaire, du moins dans notre modèle. Il faut néanmoins prendre en considération un manque de sensibilité de notre méthode d'extraction qui est soulignée par l'observation du tyrosol sulfaté dans le milieu extracellulaire d'un seul de nos échantillons. De plus, l'absence de l'hydroxytyrosol sulfaté alors que l'hydroxytyrosol est observé, au moins dans les milieux extracellulaires, peut souligner une incapacité enzymatique, une dégradation ou encore une extraction inadaptée.

Dans leur ensemble, ces résultats préliminaires ouvrent des interrogations, notamment sur notre modèle d'étude. Afin d'approfondir ce sujet, il serait judicieux de caractériser l'activité enzymatique de la COMT et des sulfotransférases dans les cellules SK-N-SH, en fonction des conditions de traitements. De plus, les cellules SK-N-SH sont des cellules humaines reproduisant un phénotype neuronal et sont faciles à cultiver, ce qui en fait un bon modèle d'étude pour les maladies neurodégénératives. Cependant, comme la plupart des lignées immortalisées, cette facilité de culture a demandé des sacrifices métaboliques. Ainsi, elles ne présentent pas tout le métabolisme neuronal qui peut exister *in vivo*. Ces déficiences métaboliques sont à prendre en compte dans les futures analyses sur le devenir de ces composés phénoliques dans les systèmes biologiques, tout comme dans leur habileté à traverser les cellules épithéliales servant de modèle de BHE.

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. Le stress oxydatif : le déséquilibre du siècle

La notion de stress est apparue au cours du siècle dernier, dans les années 1950 (Selye 1955) et le concept de stress oxydatif est apparu en 1985 (Sies 1985). Aujourd'hui, il est largement admis que l'état rédox de l'organisme dans son ensemble joue un rôle primordial dans le maintien de la santé (Sies 2015). Sa régulation s'opère grâce à une multitude de facteurs sensibles à l'oxydation, agissant comme des commutateurs « on/off » (Jones and Sies 2015), notamment des protéines qui peuvent être modifiées de manière réversible ou irréversible, générant une modification de leurs fonctions et de leurs impacts cellulaires, tissulaires et de l'organisme en entier (Go and Jones 2013).

Le déséquilibre rédox au cœur des MND

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production d'EROs et les systèmes de défenses antioxydantes. L'efficacité de la chaîne mitochondriale de transport des électrons diminue avec l'âge et génère une augmentation de la production de radicaux de type superoxyde (Ojaimi, Masters et al. 1999, Lenaz, Bovina et al. 2002) alors qu'en parallèle, les défenses antioxydantes diminuent (Rebrin and Sohal 2008). Cette surproduction d'EROs est associée à une diminution des défenses antioxydantes et est particulièrement exacerbée chez les patients souffrant de la MA ou de la MP (von Bernhardt and Eugenín 2011).

Il devient une nécessité d'améliorer les stratégies thérapeutiques

Les traitements proposés aujourd'hui pour la MA ou la MP sont palliatifs à défaut d'être curatifs. Pour la MA, l'ARICEPT® (Donépézil), l'EXELON® (rivastigmine) ou le REMINYL® (galantamine) sont des inhibiteurs de la cholinestérase qui permet de limiter la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans le maintien de la mémoire (Société Alzheimer Canada 2019). Dans le cas de la MP, le LEVODOPA®, est converti en dopamine dans le cerveau et permet de pallier transitoirement le déficit de ce neurotransmetteur, tandis que les autres médicaments ont pour but de limiter la dégradation de la dopamine (Canada 2019). Ces traitements ont une efficacité symptomatique, mais ne limitent pas la progression de la neurodégénérescence.

Depuis plusieurs années, les études scientifiques se sont tournées vers la recherche de phytonutriments originellement présents dans l'alimentation pouvant avoir des propriétés bioactives permettant de limiter le développement des maladies chroniques liées à l'âge et plus particulièrement celui des maladies neurodégénératives (Ramassamy 2006, Doggui, Belkacemi

et al. 2013, Chao, Chen et al. 2014, Belkacemi and Ramassamy 2015, Dey, Bhattacharya et al. 2016). Les composés phénoliques semblent apporter une partie de la réponse.

II. L'étude des composés phénoliques à la frontière de la chimie et de la biologie

Les composés phénoliques agissent à travers différentes voies. Ils peuvent se comporter en antioxydant grâce à leur capacité à donner des électrons et des atomes d'hydrogène à travers leurs fonctions hydroxyles. Dans ces situations, les composés phénoliques sont donc capables de céder un atome d'hydrogène à une espèce ERO qui se transforme en une espèce moins toxique, le radical phénoxy ou semiquinone générée est stabilisé grâce à la délocalisation électronique sur le noyau phényle. Cette propriété de « scavenger » permet de stopper les réactions en chaîne notamment dans le cas de la peroxydation des lipides (Ingold and Pratt 2014). Ce sont généralement de bons chélateurs des métaux de transition ce qui permet d'inhiber la réaction de Fenton et donc la production de radicaux hydroxyles (Singh, Arseneault et al. 2008) (Paiva-Martins and Gordon 2005, Tzika, Papadimitriou et al. 2008). De plus, les capacités de donneur d'atomes d'hydrogène des composés phénoliques leur permettent de créer des interactions fortes avec d'autres molécules et donc interagir avec leur environnement (Bors and Michel 2006) (Ingold and Pratt 2014). Cette propriété semble à l'origine de certaines activités inhibitrices comme leur capacité à inhiber certaines isoformes du cytochrome P450, certaines cyclo- ou lipo-oxygénases ainsi que la xanthine oxydase (Cos, Ying et al. 1998, Parr and Bolwell 2000). Cependant, leurs mécanismes d'action demandent encore de plus amples investigations pour être réellement compris.

II.A. Les transferts d'électrons à l'origine de la régulation rédox :

Le stress oxydatif peut être défini, en se basant sur l'équation de Nernst (annexe II) qui caractérise le rapport $[Ox]/[Red]$, comme un déséquilibre rédox entre les espèces oxydées et les espèces réductrices de la cellule en faveur des espèces oxydées. Les principaux couples rédox en milieu cellulaire sont (GSSG/GSH, $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$, cystine/cystéine, thiorédoxine_{ox}/thiorédoxine_{red} et glutarédoxine_{ox}/glutarédoxine_{red} (von Bernhardt and Eugenín 2011))(Jones 2008). Les transferts d'électrons étant au cœur des processus de régulation de l'état rédox cellulaire, l'une des propriétés des composés phénoliques les plus étudiées est leur capacité à donner des électrons par l'oxydation de leurs fonctions phénoliques (Leopoldini, Marino et al. 2004, Ingold and Pratt 2014, Lin, Li et al. 2015). Selon l'échelle d'oxydoréduction, plus le potentiel

standard d'un couple rédox est bas, plus l'espèce réduite de ce couple cède facilement ses électrons pour donner l'oxydant conjugué de ce couple (voir chap 1). Cependant, les milieux biologiques ne sont pas des conditions standards (25 °C, 14,5 psi, 1 M) ; ce qui nécessite l'étude de l'oxydation des composés phénoliques dans des conditions proches des conditions physiologiques pour avoir un aperçu de leur comportement *in vivo*. C'est pourquoi tous nos travaux ont été réalisés dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4, le même qu'utilisé dans les essais sur culture cellulaire.

Cependant, la connexion entre les propriétés chimiques et biologiques des composés phénoliques n'est pas toujours évidente (Fraga 2007). Pour se rapprocher des conditions physiologiques, les outils électrochimiques sont pertinents, car ils permettent l'étude des propriétés rédox dans un système analytique simplifié, rapide (réactions de l'ordre des millisecondes à des secondes) et sensible (Lin, Li et al. 2015). En effet, nous avons montré que l'association de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique et du tyrosol à des concentrations physiologiques (1 µM) était capable de diminuer la concentration de H₂O₂ (200 µM). Or, les études de réactivité des composés phénoliques avec le H₂O₂ sont le plus souvent réalisées à travers la réaction de Fenton, où les mécanismes de piégeage du H₂O₂ et les mécanismes de chélateurs des métaux sont engagés, ou alors par voie enzymatique à l'aide de peroxydases. Contrairement à l'électrochimie, où l'électrode joue le rôle d'oxydant, ces moyens d'études nécessitent la présence d'inducteurs de radicaux et multiplient les potentiels intervenants réactionnels (Ikeda and Kano 2001). Plus les composés phénoliques sont de bons donateurs d'atomes d'hydrogène, plus ils vont permettre la transformation du H₂O₂ en eau (Bendary, Francis et al. 2013). Cette propriété est aussi influencée par la stabilité du radical phénoxy (Ma, Li et al. 2011). Dans les conditions utilisées dans ce travail, l'association des trois composés phénoliques du Mix 1 augmente soit la capacité de donateurs d'atome d'hydrogène soit la stabilité des radicaux formés grâce à la résonance et/ou à des liaisons hydrogène intra/intermoléculaires (Ma, Li et al. 2011). En effet, nous avons montré qu'en conditions oxydatives, la combinaison du Mix 1 permet une régénération partielle de l'oleuropéine, ce qui augmente la disponibilité de sa partie catéchol et donc les capacités de donneur d'électron dans le Mix 1 (chapitre 3). De plus, cette combinaison permet de générer des produits spécifiques, probablement par couplage des composés phénoliques natifs et oxydés. Il est envisageable que la génération de ces néocomposés entre en jeu dans la potentialisation de la réactivité des composés phénoliques lorsqu'ils sont combinés, comme cela a déjà été suggéré (Peyrat-Maillard, Cuvelier et al. 2003, Antenucci, Panzella et al. 2016, Zhang, Wang et al. 2018).

Cependant, cette association ne potentialise pas de façon significative leur capacité à piéger le radical superoxyde, bien que la faible réactivité du tyrosol, principalement menée par un transfert de proton (Rene, Abasq et al. 2010), semble compensée par la présence de l'oleuropéine et de l'acide *p*-coumarique. Cette observation confirme d'une part que la réactivité des composés phénoliques envers les différents EROs varie nettement en fonction de la structure des composés (Dangles 2012, Mathew, Abraham et al. 2015). D'autre part qu'il est nécessaire d'utiliser plusieurs tests antioxydants pour évaluer l'efficacité d'un composé ou d'une association de composés (Prior, Wu et al. 2005, Apak, Gorinstein et al. 2013). Enfin, la réactivité *in vitro* n'est pas toujours le reflet de l'efficacité biologique (Di Benedetto, Vari et al. 2007, Martins, Barros et al. 2016) (Rossi, Caruso et al. 2017). Cette observation indique que la prédominance des transferts d'électrons dans la régulation du stress oxydatif est, d'une part encore mal comprise dans les systèmes biologiques, et que d'autre part ce n'est pas le seul moyen d'action des composés phénoliques.

II.B. Les composés phénoliques en conditions de cultures cellulaires :

L'utilisation des modèles cellulaires pour étudier l'impact des composés phénoliques dans le contexte des maladies neurodégénératives est primordiale pour établir leur efficacité neuroprotectrice au niveau moléculaire (Figueira, Menezes et al. 2017). Les composés phénoliques sont des composés sensibles à l'oxydation (formation de radical phénoxyde lors d'une oxydation à un électron des monophénols ou de semiquinone pour les catéchols ou formation de quinone lors de l'oxydation à deux électrons). Les différents substituants présents sur le noyau benzénique influencent fortement la densité électronique présente sur le noyau des composés phénoliques et donc la stabilité des espèces formées suite à l'oxydation (Song and Buettner 2010).

Ainsi, bien que le caractère proélectrophile des composés phénoliques, dépendant de leur potentiel d'oxydation (Jovanovic and Simic 2000), soit aujourd'hui reconnu comme faisant partie intégrante de leur mécanisme d'action notamment à travers l'activation du facteur de régulation rédox Nrf2 lors de concentrations importantes (Satoh, Stalder et al. 2015), ou bien dans l'inhibition du facteur NF- κ B (Cornwell and Ma 2008), il est nécessaire de souligner un processus rarement décrit dans les études cellulaires portant sur les composés phénoliques. En effet, leur capacité à se transformer en quinone est suspectée d'être à l'origine d'une potentielle toxicité, mais aussi de leurs effets protecteurs à travers l'activation du facteur Nrf2 (Kotronoulas, Pizarro et al. 2013) (Wang, Hayes et al. 2010). Dans un contexte cellulaire, cette toxicité ne proviendrait pas directement de la forme quinone, mais plutôt de la génération de H₂O₂ consécutive à l'auto-oxydation des composés phénoliques dans le milieu de culture cellulaire (Chichirau, Flueraru et

al. 2005, Halliwell 2008). Par exemple, l'hydroxytyrosol, bien que toujours présent après 24h d'incubation, génère du H₂O₂ dans les milieux de cultures cellulaires, contrairement au tyrosol moins sensible à l'auto-oxydation (Long, Hoi et al. 2010). Cependant, en présence de 10 µM d'hydroxytyrosol, la quantité de H₂O₂ produite est minime (< 25 µM après 1h d'incubation). De fait, cette production de H₂O₂ est dépendante de la concentration en composés phénoliques et devient toxique en dehors des concentrations potentiellement physiologiques (> 25 µM) (Dashwood, Orner et al. 2002), d'où l'intérêt d'utiliser de faibles quantités de composés phénoliques, par exemple 1 et 0,1 µM comme présenté dans ce travail. De plus, la production de H₂O₂ dans le milieu de culture semble être inhibée par la présence de sels de pyruvate (Odiatou, Skaltsounis et al. 2013), tels qu'utilisés dans nos études. Enfin, la diminution du taux d'oxydation des composés phénoliques lorsqu'ils sont combinés, telle qu'observée dans le chapitre 3, associée au caractère neuroprotecteur du Mix1, induit notamment par une diminution des EROs intracellulaires, permet d'émettre l'hypothèse qu'en conditions de culture cellulaire cette « autoprotection oxydative » permet de limiter l'oxydation des composés phénoliques dans le milieu de culture.

De plus, comme nous l'avons observé dans ce travail, les composés phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes directes grâce à leur réactivité notamment envers le radical superoxyde, mais aussi envers le peroxyde d'hydrogène (Chimi, Cillard et al. 1991, Rice-Evans 1996, Van Acker, Van Den Berg et al. 1996, Benavente-Garciaa, Castillo et al. 2000, Wright, Johnson et al. 2001, Vuolo, Lima et al. 2019), et peuvent aussi inhiber ou induire certaines voies cellulaires comme le facteur Nrf2 et le facteur Nf-kB (Sato and Lipton 2007, Rendeiro, Rhodes et al. 2015, Lipton, Rezaie et al. 2016, Parvez, Long et al. 2018). Cette dernière caractéristique est primordiale car ces deux facteurs de transcription rédox ont été suggérés à plusieurs reprises comme cible thérapeutique d'intérêt pour diminuer la progression de la MA et de la MP (Scapagnini, Vasto et al. 2011, Tufekci, Bayin et al. 2011, Wang, Li et al. 2017, Seo, Fischer et al. 2018). Dans nos travaux, nous avons observé une diminution de la production d'EROs associée à une forte diminution de l'induction du facteur Nf-kB et du facteur Nrf2. Il existe une relation entre l'activation du facteur Nf-kB, majoritairement pro-oxydant, et l'activation du facteur Nrf2 (Wardyn, Ponsford et al. 2015). Le facteur Nrf2 est maintenu inactif dans le cytoplasme par le facteur rédox sensible Keap1, qui est connu pour interagir avec les composés électrophiles comme les quinones issus de l'oxydation des composés phénoliques (Wang, Hayes et al. 2010). La diminution du facteur Nrf2 nucléaire acteur est le reflet d'une diminution des conditions oxydatives cellulaires et / ou d'une diminution de sa phosphorylation, étapes clef pour sa translocation nucléaire. Bien que les

composés phénoliques de l'huile d'olive, notamment l'oleuropéine à travers sa moitié hydroxytyrosol, activent ce facteur en conditions oxydatives (Sun, Wang et al. 2017), il est envisageable que l'inhibition de l'activation du facteur Nf-kB génère une diminution de la production des facteurs pro-inflammatoires et des ROS associés, et donc une diminution de l'activation du facteur Nrf2.

II.C. Quel est le devenir des composés phénoliques dans un contexte de stress oxydatif ?

L'efficacité antioxydante des composés phénoliques étudiée dans un contexte cellulaire met en avant leurs potentiels bioactifs, mais l'impact de leurs modifications métaboliques impliquées dans l'amélioration de l'homéostasie cellulaire reste obscur (Rendeiro, Rhodes et al. 2015, Figueira, Garcia et al. 2017). Il a été suggéré que leurs concentrations tissulaires, notamment au niveau cérébral, pouvaient difficilement dépasser l'ordre du nM (Schaffer and Halliwell 2012, Figueira, Garcia et al. 2017), ce qui supporte leurs effets locaux (Gasperotti, Passamonti et al. 2015), mais limite leurs potentiels d'action en temps qu'antioxydants directs (Forman, Davies et al. 2014, Rendeiro, Rhodes et al. 2015). En effet, bien que leur concentration intracellulaire ne leur permettent peut-être pas d'agir en tant que piègeurs d'EROs en quantité pertinente, leur oxydation a lieu et peut participer à la signalisation cellulaire (Forman, Davies et al. 2014). Cependant, les connaissances sur leur métabolisme cérébral restent encore faibles, d'autant plus en conditions oxydatives (Gasperotti, Passamonti et al. 2015, Figueira, Garcia et al. 2017, Figueira, Menezes et al. 2017).

La variabilité du métabolome est un frein à l'isolement et à l'identification des métabolites issus de transformations enzymatiques et oxydatives des composés phénoliques dans un contexte cellulaire (Vinaixa, Schymanski et al. 2016).

Afin d'affiner la recherche des métabolites de composés phénoliques issus de l'huile d'olive soumis à des conditions oxydatives, un moyen est de limiter la génération de données en utilisant des systèmes simplifiés, donc en sortant d'un système biologique. Les outils mimant l'oxydation des composés phénoliques sont d'un intérêt particulier lorsque l'on s'intéresse à leur devenir en conditions oxydatives (Antolovich, Bedgood et al. 2004, Roche, Dufour et al. 2005), mais impose de diversifier les méthodes utilisées. En effet, dans le chapitre 3, nous avons généré des produits issus de l'oxydation individuelle des composés phénoliques en utilisant l'électrode comme

oxydant. Or, seuls quelques composés que nous avons identifiés ont préalablement été retrouvés par l'intermédiaire d'autres méthodes d'oxydation (Tableau 17). Les métabolites peuvent donc différer en fonction des méthodes d'oxydations employées. Ainsi, croiser les données connues sur la formation de métabolites dans des conditions proches de celles pouvant exister au niveau cellulaire, comme lors de l'oxydation par la réaction de Fenton ou par l'électrode à pH physiologique tel qu'effectué dans le chapitre 3, permet i) d'accroître les connaissances sur la réactivité des composés phénoliques entre eux, ii) d'identifier d'éventuels composés bioactifs, iii) d'alimenter les données spectrales sur les éventuels métabolites issus de l'oxydation (Goodacre, Broadhurst et al. 2007, Kind, Scholz et al. 2009, Vinaixa, Schymanski et al. 2016).

En effet, la variété de structures est complexe à étudier, même avec des technologies de pointe comme la spectrométrie de masse à haute résolution ou la résonance magnétique nucléaire (Vinaixa, Schymanski et al. 2016). Il existe quatre niveaux d'identification des métabolites qui nécessitent la confrontation des propriétés orthogonales d'un métabolite (rt, m/z , spectre de fragmentation, spectre RMN) à des composés standards analysés dans les mêmes conditions, ou à la littérature et à des bases de données publiques ou commerciales (Goodacre, Broadhurst et al. 2007). Plusieurs bases de données LC/MS publiques existent, comme Human Metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>) METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), MassBank (<http://www.massbank.jp>), GNPS (<http://gnps.ucsd.edu/>), ReSpect (<http://spectra.psc.riken.jp/>), FoodDB (<http://foodb.ca/>) et permettent l'annotation des spectres des composés obtenus et l'identification de la structure chimique. Cependant, ces BDD sont encore loin de posséder toutes les données expérimentales des métabolites connus (Vinaixa, Schymanski et al. 2016). En effet, dans le chapitre 3, nous avons montré la génération de néocomposés issus de dimérisation, de trimérisation et même d'oligomérisation pour le tyrosol, conséquentes à l'oxydation des composés phénoliques, mais sans pouvoir tous les identifier structurellement par comparaison de leur spectre de fragmentation. La production d'une plus grande quantité de ces métabolites, associée à une purification et à une analyse en spectroscopie RMN pourrait être favorable à l'identification structurale de ces composés (Consonni and Cagliani 2019). Néanmoins, notre travail permet d'enrichir les connaissances actuelles sur les métabolites potentiels de ces composés phénoliques et offre des données supplémentaires dans l'étude de leur transformation oxydative. De plus, nous avons montré la production de composés spécifiquement issus de couplages entre les formes natives et oxydés de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique lors de leur oxydation combinée. Nous avons observé que ces néocomposés, associés aux formes natives non oxydées, pouvaient participer à la neuroprotection induite par le Mix1 telle qu'observée dans le chapitre 2. Nous confirmons ainsi que les métabolites issus de l'oxydation des composés

phénoliques peuvent avoir un rôle biologique d'importance, comme le démontre une étude récente décrivant l'efficacité antitumorale d'un métabolite issu de l'oxydation (par la réaction de Fenton) de l'acide *p*-coumarique méthylé (Fási, Di Meo et al. 2019).

Cependant, dans le chapitre 4 nous n'avons pas été en mesure d'observer leur formation dans un contexte cellulaire. Soit ces composés n'ont pas été formés dans nos conditions cellulaires ou alors en quantités trop faibles pour être détectées, soit l'extraction était inadéquate. Des travaux ultérieurs, proposés dans la section « perspective », seront nécessaires afin de répondre à cette question.

III. Biodisponibilité cérébrale

Un aspect primordial à prendre en compte dans la recherche d'une formulation préventive ou curative est la biodisponibilité des composés (Jovanovic and Simic 2000), qui se reflète par leur capacité à atteindre l'organe cible, mais aussi à s'accumuler dans les cellules (Batinić-Haberle, Rebouças et al. 2010). L'effet bénéfique des composés phénoliques dépend de la quantité consommée et de leur biodisponibilité (Castro-Barquero, Lamuela-Raventós et al. 2018). Ils subissent des conjugaisons importantes, principalement des glucuronidations, des sulfatations et des méthylations (Visioli and Galli 2001, Marrugat, Covas et al. 2004) (Corona, Tzounis et al. 2006).

Un petit nombre d'études ont retrouvé de l'oleuropéine, du tyrosol ou de l'acide *p*-coumarique ou leurs dérivés au niveau cérébral *in vivo* (voir chapitre 1) (D'Angelo, Manna et al. 2001) (Serra, Rubio et al. 2012) (Gasperotti, Passamonti et al. 2015). Le chapitre 4 de ce travail avait pour objectif de compléter les données actuellement disponibles sur la métabolisation de ces composés phénoliques dans un contexte neuronal.

Tableau 17 : Résumé des métabolites issus de l'oxydation par voie électrochimique des composés phénoliques préalablement identifiés lors de l'utilisation d'autres méthodes d'oxydation.

Compound name	m/z	MS ²	Produce from other oxidation methods
Metabolite from <i>p</i>-coumaric acid oxidation			
C ₁ iso- <i>p</i> -coumaric acid	163	126, 119	Two isomers of <i>p</i> -coumaric acid (Kort, Vonk et al. 1996) AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005) photoisomerization (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)
C ₃ <i>p</i> -coumaric acid dimer ^a	325	281, 237	AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005) Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) (Antolovich, Bedgood et al. 2004) Biomimetic catalysis (iron-porphyrin/H ₂ O ₂) (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)
C ₄ <i>p</i> -coumaric acid dimer ^a	325	281	Enzymatic oxidation (Laccase pH 5) (Chakroun, Bouaziz et al. 2012)
C ₆ Decarboxylated <i>p</i> -coumaric acid dimer	281	237	
C ₇ Decarboxylated <i>p</i> -coumaric acid dimer	281		AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005)
Metabolite from tyrosol oxidation			
T ₁ unknown	1794		Possibly oligomers from radical coupled reaction as observed with peroxidase- H ₂ O ₂ oxidation (Antenucci, Panzella et al. 2016)
T ₂ unknown	1820	1761	
T ₄ unknown	1499	1449, 1414, 1240	Cf T ₁ and T ₂
T ₅ Tyrosol dimer	273	243, 254	Enzymatic oxidation (laccase pH 5) (Chakroun, Bouaziz et al. 2012, Chakroun, Bouaziz et al. 2013)
T ₆ Tyrosol trimer	409	391, 341, 273	Tyrosol trimer was observed as acetylated form by Antenucci et al. (Antenucci, Panzella et al. 2016)
Metabolite from oleuropein oxidation			
O ₂ Oxidation product of OHT	169	151	Observed following hydroxytyrosol oxidation : Fenton Fe ²⁺ / H ₂ O ₂ Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5) (Di Maio, Esposto et al. 2011) Enzymatic oxidation (peroxydase H ₂ O ₂ pH 7.4) (De Lucia, Panzella et al. 2006) Observed in olive oil wastes (Rodríguez, Lama et al. 2009)
O ₅ 11-Methyl-Oleoside	403	223, 179, 359, 161	Observed in olive oil wastes (pomace and pulpe) (Cardoso Susana, Guyot et al. 2004)
O ₈ 10- Hydroxy-oleuropein	555	537, 393, 403	Observed in olive oil wastes (pomace and pulpe) (Cardoso Susana, Guyot et al. 2004)
O ₉ unknown	585	523, 541, 361, 199, 403	Similar mass id as Oleuropein-EtOH adduct was observed following UV Radiation (λ _{max} = 254 nm) (Longo, Morozova et al. 2017), but MS ² fragmentation does not correspond.
O ₁₇ Oleuropein diglucoside	701	377, 307, 275	Observed in olive oil wastes (pomace and pulpe) (Cardoso Susana, Guyot et al. 2004)
O ₂₆ Iso Ole dimer [2M -2H - H]	1077	813, 673, 539	Autooxidation (under O ₂) (Gentile, Uccella et al. 2017)

^a: taking into account the several possibilities of *p*-coumaric acid dimer, we were not able to identify the exact structure of these dimer and its isomer.

III.A. Passage de la BHE

La biodisponibilité cérébrale dépend de la capacité des composés phénoliques à franchir la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière dynamique est extrêmement sélective et permet le passage des formes aglycones des composés phénoliques, probablement par diffusion passive ou en utilisant certains récepteurs (Lee, Maliakal et al. 2002, Figueira, Menezes et al. 2017). Ainsi, l'oleuropéine aglycone est retrouvée dans le cerveau de rat (Serra, Rubio et al. 2012), mais pas sa forme native. Dans le chapitre 2 et le chapitre 3 de ce travail, nous avons utilisé les cellules SK-N-SH comme modèle d'étude. Ces cellules sont issues d'une lignée immortalisée avec un phénotype neuronal et présentent l'avantage d'exprimer plusieurs marqueurs neurochimiques (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978). De plus, elles sont d'origine humaine, organisme pour lequel il est difficile d'obtenir des cellules primaires et l'utilisation d'une culture de cellules homogènes telles que les SK-N-SH est préférentielle à l'utilisation de cultures cellulaires plus complexes (De la Luz-Hdez 2012). Nous avons observé que les trois composés phénoliques constitutifs du Mix1 étaient retrouvés sous leurs formes natives, dans les extraits cellulaires. L'accumulation des monophénols comme le tyrosol ou l'acide *p*-coumarique peut être à l'origine de leur caractère neuroprotecteur (Di Benedetto, Vari et al. 2007) en permettant un échelonnement temporel de l'activité antioxydante. De plus, considérant l'activité inhibitrice du facteur Nf- κ B de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'acide *p*-coumarique, l'accumulation de ces composés à l'échelle cellulaire permettrait une prolongation de cette activité inhibitrice et donc un effet neuroprotecteur durable dans le temps.

Nous avons retrouvé l'oleuropéine native et donc glycosylée, contrairement à ce qui a été observé dans les cerveaux de rats cités précédemment. Cette discordance peut prendre son origine dans notre modèle d'étude. En effet, dans notre modèle, les composés phénoliques ne subissent que des modifications relatives à la présence du H₂O₂ dans le milieu et à l'activité métabolique des cellules neuronales (en conditions basales et en conditions de stress), et non pas celles relatives au passage entéro-hépatique, sanguin et cérébral d'un organisme entier.

Cependant, en utilisant un modèle *in vitro* de la BHE (monocouche de cellules endothéliales de souris – cellules Bend3) nos résultats préliminaires montrent que l'oleuropéine (comme les monophénols) est retrouvée dans le milieu basal sous sa forme native. Il y a donc eu passage de la forme glycoside à travers les cellules endothéliales. Nous pouvons émettre l'hypothèse que chez les animaux, l'oleuropéine n'arrive pas sous sa forme glycoside au niveau de la BHE, d'où son absence dans le cerveau. Cependant, il faut prendre en considération le fait que les cellules Bend3, bien que reconnues comme modèle cellulaire de la BHE présentent une résistance transépithéliale plus faible que celle retrouvée *in vivo* (Li, Simon et al. 2010), et permettent un

passage transcellulaire d'ions chargés. Un bon moyen d'évincer cette hypothèse serait d'utiliser de la fluorescéine, qui présente une taille moléculaire proche de celle des composés phénoliques étudiés (332 Da), pour tester l'étanchéité de la monocouche de cellules, en plus du test au dextran.

À notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'interaction de l'oleuropéine et de la BHE. Ces résultats laissent entrevoir une possibilité pour l'oleuropéine de traverser la BHE, et pourraient mener à des stratégies permettant d'augmenter sa biodisponibilité cérébrale, par exemple l'encapsulation dans des polymères biocompatibles. Des approches similaires sont à l'étude pour augmenter la biodisponibilité de certains composés phénoliques comme la curcumine (Paka and Ramassamy 2017).

III.B. Transformations métaboliques

En effet, il est aujourd'hui évident que les composés phénoliques après ingestion subissent des transformations (via le tractus digestif, le cycle entéro-hépatique et le microbiote intestinal notamment) et engendrent de nouveaux métabolites. Face aux faibles quantités de composés phénoliques retrouvées dans le plasma et les tissus, il a été suggéré que les composés issus de leur métabolisation pouvaient prendre part à leurs propriétés (Fraga 2007, Pimpão, Ventura et al. 2015, Figueira, Garcia et al. 2017, Gonzalez-Sarrias, Nunez-Sanchez et al. 2017, Lopez, Montserrat-de la Paz et al. 2017, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018, Serreli and Deiana 2018). De fait, plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques et antioxydantes (Tableau 18). Parmi les différents métabolites connus, les composés sulfatés semblent posséder une activité neuroprotectrice intéressante (López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018). Nous avons retrouvé du tyrosol sulfate dans l'un de nos échantillons, comme décrit dans le chapitre 4, ce qui est le témoignage d'une sulfatation active dans les cellules SK-N-SH. Il est envisageable que l'apparition de ce composé participe aux effets neuroprotecteurs du Mix 1 observés aux chapitres 2 et 3. Par ailleurs, le tyrosol sous sa forme glucuronide possède toujours la capacité d'inhiber le facteur Nf-kB (Deiana, Incani et al. 2011, López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018), mais, bien que retrouvé dans le plasma humain (de la Torre-Carbot, Chavez-Servin et al. 2007), ce métabolite n'a pas été décrit dans le cerveau *in vivo* et n'a pas non plus été observé dans notre travail. On peut supposer que la glucuronidation du tyrosol ne soit pas un prérequis pour induire l'inhibition de l'activation du facteur Nf-kB.

III.C. Interaction avec les membranes

Un autre aspect à prendre en compte dans l'efficacité des composés phénoliques est leur localisation, qui est déterminante pour leur activité antioxydante et donc dans leur efficacité. Dans un système membranaire hydrophobe, la capacité antioxydante de l'oleuropéine est plus importante que celle de l'hydroxytyrosol ou de l' α -tocophérol en raison d'une interaction avec des phospholipides membranaires (Saija, Trombetta et al. 1998, Paiva-Martins, Gordon et al. 2003). Dans des érythrocytes, 24 % de l'oleuropéine ont été retrouvées dans le compartiment cytosolique et 3 % dans le compartiment membranaire (Saija and Uccella 2000). Cependant, la pénétration des composés phénoliques dans les membranes phospholipidiques n'est pas claire. L'étude de l'interaction de l'oleuropéine avec un modèle de membranes biologiques en condition physiologique montre que 80 % de l'oleuropéine interagit avec les phospholipides des membranes (Caturla, Pérez-Fons et al. 2005). Alors que certains auteurs proposent une insertion de l'oleuropéine dans les membranes grâce à une interaction avec les phosphatidylcholines (Saija Antonella, Trombetta Domenico et al. 1998), d'autres proposent une interaction de surface uniquement, en conditions physiologiques (Paiva-Martins, Gordon et al. 2003, Caturla, Pérez-Fons et al. 2005). Le caractère amphiphile de l'oleuropéine lui permettrait d'interagir avec les groupements polaires de certains phospholipides chargés négativement à pH physiologique (Caturla, Pérez-Fons et al. 2005, Paradiso, Di Mattia et al. 2016). Dans nos travaux, nous avons observé l'oleuropéine dans les extraits des cellules SK-N-SH. Notre protocole d'extraction n'exclut pas les membranes biologiques du contenu cytosolique. Il est donc important de prendre en compte que nos observations peuvent être dues d'une part à une internalisation de l'oleuropéine, mais aussi à une interaction avec les membranes cellulaires.

Les antioxydants lipophiles ou amphiphiles peuvent inhiber les EROs capables de diffuser à travers les membranes (Niki, Yoshida et al. 2005). Les interactions membranaires de l'oleuropéine peuvent donc être à l'origine de sa capacité à inhiber la toxicité des protéines amyloïdogéniques (comme l'amyloïde- β , l'amyline ou l' α -synucléine) qui forment des oligomères capables de perturber la membrane plasmique et de provoquer la génération d'EROs (Rigacci, Guidotti et al. 2010, Caruana, Neuner et al. 2012, Diomede, Rigacci et al. 2013). Contrairement à l'oleuropéine, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique ne perturbent pas les membranes et semblent rester en surface (Ota, Abramovi et al. 2011, Lopez, Bermudez et al. 2014, Paradiso, Di Mattia et al. 2016). Fabre G. et al. ont montré que l'inhibition de la peroxydation lipidique synergique entre la vitamine E (lipophile), la vitamine C (plus polaire) et la quercétine (un flavonoïde) était probablement attribuable à une différence de localisation dans la membrane lorsque la vitamine E et la quercétine sont combinées, favorisant l'inhibition des EROs et la régénération des antioxydants

entre eux (Fabre, Bayach et al. 2015{Lopez, 2014 #4537). Il est envisageable que la répartition dans les membranes des composés phénoliques étudiés dans ce travail soit distincte et que cela puisse contribuer à la potentialisation de leurs effets. Grâce à des simulations moléculaires dynamiques et l'utilisation d'un modèle de membrane cellulaire constitué de DOPC (1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine) et de PLPC (1-palmitoyl-2-linoléoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine), il est possible d'évaluer la position des composés phénoliques dans une membrane modèle (Podloucká, Berka et al. 2013, Di Meo, Fabre et al. 2016). Une étude plus approfondie de l'interaction de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique et du tyrosol avec les membranes plasmiques individuellement ou en combinaison permettrait certainement d'apporter de plus amples résultats pour continuer à décortiquer le fonctionnement synergique des composés phénoliques entre eux.

IV. Finalement, de l'huile d'olive ou une formulation spécifique ?

D'après le NIH (*National Institute of Health*), le maintien d'une santé cognitive se définit par une habileté à penser clairement, à apprendre et à se souvenir. Afin de garantir le maintien de ces facultés au cours du vieillissement, ils recommandent de prendre soin de sa santé, de manger des aliments sains, d'exercer une activité physique, de conserver une activité intellectuelle et des relations sociales (NIH 2019).

Il est aujourd'hui évident que l'alimentation influence l'état de santé général ainsi que la santé cognitive. À l'inverse des diètes de type Western, plusieurs diètes ont montré des effets intéressants pour la santé à travers une diminution de l'apparition des troubles cognitifs (voir Tableau 19), particulièrement la MeDi (Tableau 6– chapitre I).

IV.A. L'effet nutritionnel se suffit-il à lui-même ?

Face à la complexité de l'apport alimentaire humain, peu d'interventions cliniques ont été réalisées. Les données observationnelles viennent principalement d'études épidémiologiques et rétrospectives sur les cohortes (Swaminathan and Jicha 2014). Seule l'étude interventionnelle de Martinez-Lapiscina et al. a soumis des sujets, avec un risque élevé d'accidents cardiovasculaires, à un régime de type MeDi durant 6,5 ans (Tableau 6– chapitre I) (Martinez-Lapiscina, Clavero et al. 2013).

Certains auteurs prônent le concept de synergie appliqué à l'alimentation, qui compte i) la consommation d'un nutriment particulier, ii), mais considéré dans sa matrice alimentaire et aussi iii) considéré dans le cadre de la diète entière (Messina, Lampe et al. 2001, Steffen and Jacobs

2003). Il y a donc trois degrés de considération de l'efficacité potentielle d'un nutriment sur la santé, mais qui ne doivent pas être mise en opposition avec l'intérêt d'une supplémentation. Plusieurs études démontrent le bénéfice important d'une supplémentation nutritionnelle chez les personnes âgées (Gregorio, Diaz et al. 2003). *In vivo*, la consommation régulière (6 mois à 12 mois) de 6 mg par jour de composés phénoliques de l'huile d'olive engendre une amélioration des fonctions motrices chez la souris, corrélées à une diminution de la peroxydation des lipides dans le cerebellum par comparaison avec les souris du même âge non traitées (Pitozzi, Jacomelli et al. 2012), ce qui souligne la capacité particulière des composés phénoliques de l'huile d'olive à limiter le déclin cognitif. Plusieurs études démontrent la capacité des composés phénoliques de l'huile d'olive à limiter l'apparition des caractéristiques physiopathologiques de la MA ou de la MP (Rodriguez-Morato, Xicota et al. 2015, Angeloni, Malaguti et al. 2017) mais aucune étude ne montre le potentiel curatif d'une consommation régulière de l'huile d'olive dans le cadre des maladies neurodégénératives.

Dans le chapitre 2, nous avons observé que les composés phénoliques utilisés individuellement ne possédaient pas d'effet neuroprotecteur dans notre modèle cellulaire. Or, les concentrations testées (jusqu'à 10 μ M) étaient supérieures à celles utilisées pour le Mix 1. Bien qu'à travers l'alimentation l'apport de composés phénoliques totaux soit estimé à 1 g/j (Manach, Scalbert et al. 2004), cette absence d'effet curatif de l'huile d'olive, associé à l'absence d'effet des composés phénoliques utilisés seuls dans nos conditions, amène à considérer d'une part que les proportions de composés phénoliques présents dans l'huile d'olive ne sont pas adéquates pour freiner les maladies neurodégénératives après leurs apparitions et d'autre part qu'ils possèdent des propriétés complémentaires pour lutter contre la neurodégénérescence induite par le stress oxydatif. Des formulations particulières comme le Mix 1 que nous proposons sont donc des approches de nouvelle génération pertinente à étudier en vue d'utiliser ces composés d'origine naturelle et sans effet secondaire démontré pour limiter la progression des MND.

IV.A. Potentialiser les effets des composés phénoliques ?

Malgré l'intérêt des composés phénoliques pour limiter le déclin cognitif chez les personnes saines, les études cliniques ne confirment pas leurs potentiels pour limiter le développement de la MA ou de la MP (Tableau 6– chapitre I)(Molino, Dossena et al. 2016). Néanmoins les composés phénoliques sont présentés comme participant activement à la synergie préventive de la MeDi (Martínez-González Miguel, Gea et al. 2019). Il a été d'ailleurs suggéré que la synergie de différents composés pouvait être importante pour avoir une activité antioxydante singulière

(McDonald, Prenzler et al. 2001). Cependant, dans le cadre d'un apport nutritionnel uniquement, la consommation de composés phénoliques est limitée par les habitudes alimentaires, mais aussi par la qualité de l'huile d'olive consommée (Owen R. W., Mier et al. 2000), de l'espèce cultivée et des conditions de fabrication et de stockage (Romero, Brenes et al. 2002). L'avantage d'une formulation particulière en vue d'une supplémentation est de contrôler ces paramètres en contrôlant la quantité et la qualité des composés phénoliques apportés quotidiennement.

. Face à l'émergence de l'intérêt des composés phénoliques pour combattre le stress oxydatif et plus particulièrement pour étudier des composés phénoliques de l'huile d'olive d'un point de vue biologique, biochimique et mécanistique, dans le cadre des maladies neurodégénératives (Casamenti and Stefani 2016), il nous a paru pertinent d'étudier l'association entre l'oleuropéine, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique. L'avantage de l'acide *p*-coumarique, outre ses propriétés préalablement décrites, est qu'il s'agit d'un composé stable, pouvant lui-même être issu d'un métabolisme microbien (Gasperotti, Masuero et al. 2014). De plus, il est retrouvé sous forme libre dans le plasma (Konishi, Hitomi et al. 2004) ce qui démontre sa biodisponibilité importante (Rechner, Kuhnle et al. 2002). De son côté, le tyrosol, tout comme l'acide *p*-coumarique est très stable, possède une réelle capacité d'inhibition du facteur Nf-kB, comme démontrée à plusieurs reprises (Di Benedetto, Vari et al. 2007, St-Laurent-Thibault, Arseneault et al. 2011) et peut être transformé en hydroxytyrosol *in vivo* (Rodriguez-Morato, Robledo et al. 2017). Enfin, l'oleuropéine en plus de sa stabilité supérieure à celle de l'hydroxytyrosol durant la digestion (voir chapitre 1), présente de meilleures capacités antioxydantes que les monophénols, peut-être transformée en oleuropéine aglycone qui a déjà montré des activités biologiques intéressantes notamment dans la stabilisation de l' α -synucléine (Palazzi, Bruzzone et al. 2018) ou de l'amyloïde (Sivakumar, Uccella et al. 2018)- β (Grossi, Rigacci et al. 2013, Leri, Oropesa-Nunez et al. 2018), et possède une moitié iridoïde au potentiel biologique et antioxydant réel (Dinda, Dinda et al. 2019). Cette formulation composée de trois composés phénoliques peut donc, *in vivo*, apporter les effets imputables à cinq composés phénoliques, soit l'acide *p*-coumarique, le tyrosol, l'oleuropéine, l'oleuropéine aglycone, l'hydroxytyrosol et en plus des dérivés secoiridoïdes. Sans oublier les effets potentiels de leurs dérivés issus de leur oxydation, comme exposés dans le chapitre 3. Cependant, contrairement à leur proportion naturelle dans l'huile d'olive où les phénols simples comme le tyrosol ou l'hydroxytyrosol sont surreprésentés en comparaison des autres types de composés phénoliques (Owen R. W., Mier et al. 2000), nous avons proposé une formulation équimolaire des trois composés afin de potentialiser leurs effets individuels. Tout comme nous avons observé une potentialisation de l'activité antioxydante de notre formulation sur les cellules

SK-N-SH, des synergies entre composés de types *o*-diphénol et monophénols ont déjà été relatées, notamment dans l'inhibition du facteur Nf-kB. Par exemple, l'association de l'hydroxytyrosol et du tyrosol, (0,5 et 1 μ M respectivement) ou encore l'association de l'acide caféique et de l'acide *p*-coumarique (0,5 et 1 μ M respectivement) (association *o*-diphénol / monophénol) ont montré une augmentation de la capacité à diminuer l'expression de ICAM-1 induite par l'activation de Nf-kB sur des cellules EA.hy926 (cellules endothéliales humaines immortalisées) en comparaison de leur activité individuelle faible (Manna, Napoli et al. 2009). De même que la combinaison d'anthocyanes et d'autres composés phénoliques, comme l'acide férulique, la rutine ou la quercétine (à une concentration de 25 μ M en équivalent de cyanidine 3-O-glucoside) peuvent diminuer l'expression de Nf-kB induit par l'IL-1 β dans les cellules Caco-2 (Parizad, Capraro et al. 2019). Récemment, une formulation d'anthocyanines et d'anthocyanidines a permis de diminuer la toxicité de l'A β sur les cellules neuronales SK-N-SH à des concentrations où les polyphénols utilisés individuellement ne montraient pas d'effet (10 μ M de chaque composé phénolique) (Belkacemi and Ramassamy 2015). Or, la potentialisation des effets des composés phénoliques du Mix 1 s'observe dès 0,1 μ M, soit 100 fois moins concentré. L'observation d'effets neuroprotecteurs à ces concentrations sur des modèles cellulaires permet l'extrapolation *in vivo* des effets observés. En effet, les concentrations plasmatiques des composés phénoliques varient de 0.5 à 2,8 ng /ml de plasma (Lee, Wang et al. 1995, de Bock, Thorstensen et al. 2013). On peut donc légitimement émettre l'hypothèse que les effets observés, et plus particulièrement l'inhibition du facteur Nf-kB, peuvent avoir lieu *in vivo*, comme cela a déjà été observé par la combinaison d'*o*-diphénol et de leur homologue monophénol (Manna, Napoli et al. 2009, Parizad, Capraro et al. 2019).

Notre étude confirme donc les études précédentes et montre qu'il y a un intérêt particulier à combiner les composés phénoliques dans une formulation spécifique dans l'objectif de les utiliser pour contrecarrer la mort des neurones induite par le stress oxydatif.

Tableau 18 : Métabolites des composés phénoliques de l'huile d'olive et leurs effets in vitro et in vivo.

Adapté de [1]

Compounds	Concentration tested	Models	Outcome	Reference
Hydroxytyrosol Glucuronide	100 µM	Rat aortic rings	Reduced endothelial dysfunction by blocking superoxide production	[2]
	2.3 µM	DPPH test	Good antioxidant and antiradical capacity	[3]
	0.01–10 µM	<i>In vitro</i> Cu-induced oxidation of LDL	Loss of antioxidant activity with respect to HT	[4]
	5–10 µM	Renal LLC-PK1 cells culture model	Protection of renal cells against H ₂ O ₂ -induced lipid peroxidation	[5]
	10–25 µM	Human hepatocarcinoma HepG2 cells	Inhibition of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum (ER) stress	[6]
Hydroxytyrosol sulfate	91 µM	DPPH test	Poor antioxidant and antiradical capacity	[3]
	2.5 – 10 µM	Caco-2 intestinal cells monolayers	Counteraction of the oxidizing action of oxidized cholesterol on intestinal cell membranes	[7]
	10 µM	Neuroblastoma (SH-SY5Y) and dopaminergic (LUHMES) neuronal cell	Protective effects against oxidative stress	[8]
Tyrosol glucuronide	0.01–10 µM	<i>In vitro</i> Cu-induced oxidation of LDL	Loss of antioxidant activity with respect to Tyr	[4]
	100 µM	Endothelial HUVEC cells monolayers	Prevention of the phosphorylation of NF-κB signaling proteins and of the over-expression of adhesion molecules	[9]
	0.1–0.5 mg/kg	Carrageenan-induced paw oedema in mice	hind Amelioration of plantar and ear edemas	[9]
Tyrosol Sulfate	2.5–10 µM	Intestinal Caco-2 cells monolayers	Counteraction of the oxidizing action of oxidized cholesterol on intestinal cell membranes	[7]
	0.1–0.5 mg/kg	Carrageenan-induced paw oedema in mice	hind Amelioration of plantar and ear oedemas	[9]
	100 µM	Endothelial HUVEC cells monolayers	Prevention of the phosphorylation of NF-κB signaling proteins and of the over-expression of adhesion molecules	[9]

Compounds	Concentration tested	Models	Outcome	Reference
Homovanillic acid	14.8 μ M	DPPH test	Good antioxidant and antiradical capacity	[3]
Homovanillyl alcohol	11.4 μ M	DPPH test	Good antioxidant and antiradical capacity	[3]
	5.4–146.5 mM	Human clinical study	Reduction of CVD and total mortality risk	[10]
	0.3–1 μ M	Renal LLC-PK1 cell culture model	Protection against H ₂ O ₂ -induced renal epithelial injury through interaction both MAP kinase and PI3 kinase pathways	[11]
	2–20 μ M	Endothelial HUVEC cells monolayers	Inhibition of ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 secretion	[12]
	5–25 μ M	Intestinal Caco-2 cells monolayers	Protection of cell membranes from oxidative damage induced by TBH	[13]
	0.5–10 mM	Human gastric adenocarcinoma (AGS) cells	Inhibition of NF- κ B driven transcription and nuclear translocation	[14]
	0.5–25 μ M	Endothelial HUVEC cells monolayers	Inhibition of cell surface expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules	[15]
	1–7.5 μ M	Human monocytic cells U937	Reduced cell adhesion and ICAM-1 expression	[16]
	10–50 μ M	Erythrocytes by blood samples obtained from trisomic patients	Decreased oxidative stress-induced ROS generation	[17]
0.25–1 μ M	Peripheral mononucleated blood cells (PBMCs)	Inhibition of oxysterols-induced production of proinflammatory cytokines, interleukin-1 β , normal T-cell macrophage migration inhibitory factor. Decreased levels of reactive oxygen species (ROS) and phosphorylation of the p38 and JNK MAP kinases	[18]	

[1].(Peyrol, 2018 #4636); [2].(Tuck, Hayball et al. 2002); [3].(Khymenets, Fito et al. 2010); [4].(Deiana, Incani et al. 2011); [5].(Giordano, Dangles et al. 2015); [6].(Atzeri A., Lucas et al. 2016); [7].(López de las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018); [8].(Muriana, Montserrat-de la Paz et al. 2017); [9].(De la Torre, Corella et al. 2017); [10].(Incani, Deiana et al. 2010); [11].(Turner, Etienne et al. 2005); [12].(Deiana, Corona et al. 2010); [13].(Sangiovanni, Colombo et al. 2012); [14].(Dell'Agli, Fagnani et al. 2006); [15].(Manna, Napoli et al. 2009); [16].(Manna, Tagliaferro et al. 2012); [17].(Serra, Deiana et al. 2017).

Tableau 19 : Études observationnelles des diètes bénéfiques pour le maintien de la santé cognitive.

Étude	Participants	Comparaison	Principaux résultats	Ref.
DR's EXTRA Study	n= 1140 « santés » genre: mixte âge : 57-78 ans suivi : 4 ans	Corrélation entre le maintien des fonctions cognitives et l'adhésion à une diète de type nordique.	Après exclusion des individus présentant des troubles cognitifs au début de l'étude, l'adhésion à la diète nordique a été positive avec un score élevé au MMSE et au CERAD.	[1]
Swedish National study on Aging and Care-Kungsholmen (SNAC-K)	n= 2223 genre: mixte âge : > 60 ans suivi : 6 ans	Diète nordique prudente (Nordic Prudent Dietary Pattern - NPDP)	Moins de diminution du score MMSE que lors d'une diète de type Western chez une population âgée dépourvue de trouble cognitif au début de l'étude. Moins de diminution du score MMSE lors d'une combinaison des diètes (diète de type Western avec comportements prudents).	[2]
Combinaison de deux cohortes : WHICAP 1992 et WHICAP 1999	n= 2148 « santés » genre: mixte âge : > 65 ans suivi : 3,9 ans	Observation des habitudes alimentaires	253 individus ont développé la MA durant l'étude. La consommation plus élevée de vinaigrette, de noix, de poisson, de volaille, de légumes et de fruits avec une plus faible consommation de produits laitiers riches en graisse, de viande rouge est associée à un plus faible risque de développer la MA.	[3]
AIBL study	n= 527 « santés » genre: âge : suivi : 3ans	Diète Australienne-style MeDi (AusMeDi).	L'adhésion plus importante à la diète AusMeDi est associée à de meilleures fonctions exécutives chez les sujets porteurs d'APOE4. Une forte adhésion à une diète Western est associée à un plus fort déclin cognitif chez les individus non porteurs de l'APOE4.	[4]
Exercise and Nutrition Interventions for Cardiovascular Health (ENCORE) Study	n= 124, pression sanguine élevée genre: mixte âge : moyenne 52 ans suivi : 4 mois	Intervention : adhésion à la diète MeDi-DASH	Amélioration des fonctions psychomotrices	[5]
Memory and Aging Project	n= 960 « santé » genre: âge : moyenne : 80.1 ans suivis : 4,7 ans	Diète MIND vs Diète MeDi-DASH	L'adhésion à la diète de type MIND a été associée à une diminution du déclin cognitif global.	[6]

Diète de type nordique = Consommation de poisson, de végétaux (mais pas de pommes de terre), de fruits et de baies, de céréales entières, de viande (dont des viandes rouges), d'alcool, d'acide α -linoléique et d'acides gras insaturés [1].

CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease : batterie de tests neuropsychologiques permettant d'évaluer la mémoire et la facilité verbale, ainsi que la mémoire non verbale [7].

MMSE = Mini-mental State Examination : tests permettant d'évaluer les capacités cognitives et la mémoire. Utilisé pour la détection de la MA.

AusMeDi = consommation de végétaux légèrement inférieure à celle observée dans la MeDi traditionnelle, mais avec une consommation supérieure de céréales, une consommation de poisson supérieure, une consommation de viande inférieure et une consommation de produits laitiers supérieure [4].

Diète de type western = caractérisée par un apport important de graisses saturées et de sucres raffinés.

DASH diète = DASH (Dietary Approach to Stop Hypertension): diète riche en fruits et en légumes, riche en produits laitiers à faible teneur en matières grasses, dont les acides gras saturés, faibles en matières grasses totales et en cholestérol, faible en viande rouge et en sucres raffinés [8].

MIND diète = MIND (Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay) : combinaison d'une diète de type MeDI et d'une diète de type DASH avec l'apport spécifique de légume à feuilles foncées et de petits fruits rouges [6].

[1].(Männikkö, Komulainen et al. 2015); [2].(Shakersain, Santoni et al. 2016); [3].(Gu, Nieves et al. 2010); [4].(Gardener, Rainey-Smith et al. 2014); [5]. (Smith P. J., Blumenthal J. A. et al. 2010); [6].(Morris, Tangney et al. 2015); [7].(NIH 2019).; [8]. (Sacks, Svetkey et al. 2001).

V. Limites de l'étude

Modèles *in vitro*

Dans notre travail, nous avons souhaité multiplier les approches pour développer une formulation au potentiel antioxydant et neuroprotecteur innovant. De plus, nous avons souhaité caractériser l'implication des mécanismes rédox associés à l'efficacité de cette formulation.

L'utilisation des outils électrochimiques en solutions modèles ont leurs avantages, comme décrits précédemment, mais ne reflète pas la complexité du monde vivant. En effet, comme souligné dans l'introduction, l'environnement immédiat est important à prendre en compte dans la réactivité des composés phénoliques. Ainsi, il est envisageable qu'une fois oxydés, les composés phénoliques réagissent préférentiellement avec les groupes thiols des peptides ou protéines intracellulaires (Kadoma and Fujisawa 2008) comme cela a déjà pu être démontré (Monks and Lau 1997, Kadoma and Fujisawa 2008). Cette observation est à prendre en compte dans l'analyse de nos résultats du chapitre 4. Par exemple, il est connu que les composés phénoliques réagissent avec le GSH intracellulaire (Monks and Lau 1997). Ainsi il aurait pu être intéressant de faire des électrolyses de notre formulation en présence de peptides / protéines rédox sensibles afin d'évaluer si les métabolites observés au chapitre 3 sont toujours susceptibles d'apparaître.

De même, l'utilisation d'une lignée cellulaire humaine, certes de type neuronale, présente des avantages de mise en œuvre, mais aussi des inconvénients relatifs à l'immortalisation des cellules (Elizabeth, Biedler et al. 1981). Les cellules que nous avons utilisées présentent un phénotype neuronal, mais ne disposent pas de toute la machinerie métabolique caractéristique des neurones dans un organisme entier. De plus, en conditions *in vivo*, de nombreux paramètres métaboliques entrent en compte, notamment l'influence des autres types cellulaires présents dans le cerveau. Cependant, les fondements de la recherche de composés bioactifs demandent des modèles simplifiés en première approche pour discriminer les acteurs potentiels, et les modèles que nous avons utilisés nous ont permis une première approche de cette formulation.

Utilisation des composés natifs plutôt que des composés métabolisés

Dans ce travail, les composés phénoliques natifs ont été utilisés. Or, comme discuté précédemment, mis à part l'acide *p*-coumarique qui est retrouvé sous forme libre dans la circulation sanguine, le tyrosol, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont retrouvés sous forme glucuronidée ou sulfatée principalement. Bien que ces formes possèdent des propriétés antioxydantes ainsi que des propriétés neuroprotectrices (Deiana, Incani et al. 2011) (López de

las Hazas, Godinho-Pereira et al. 2018), il est probable que leur réactivité soit modifiée. Ainsi, une étude de leurs propriétés rédox sous leurs formes conjuguées serait intéressante.

Confrontation à d'autres composés phénoliques au potentiel bioactif avéré

Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur les composés phénoliques issus de l'huile d'olive d'après les bénéfices particuliers observés suite à leur consommation (Chapitre I). Cependant, il faut prendre en considération que d'autres composés phénoliques ont révélés des propriétés neuroprotectrices intéressantes. Par exemple, le verbascoside (aussi connu sous le nom d'actéoside) est un composé phénolique largement répandu dans le règne végétal (il a été retrouvé dans plus de 200 espèces différentes) et aussi retrouvé dans les déchets de fabrication de l'huile d'olive. Bien qu'il ne soit pas retrouvé dans l'huile d'olive, ce phényléthanoïde glycoside se compose d'une moitié hydroxytyrosol reliée à une moitié acide caféique par l'intermédiaire de deux sucres, et possède une réactivité importante envers plusieurs types de radicaux comme le DPPH, le radical superoxyde ou encore une capacité à inhiber la peroxydation lipidique (Alipieva, Korkina et al. 2014). Plusieurs équipes de recherches se sont intéressées à sa capacité antioxydante et à son potentiel neuroprotecteur. Leurs résultats laissent entrevoir des bénéfices réels de ce composé pour lutter contre le stress oxydatif et la neurodégénérescence associée dans les modèles cellulaires relatifs à la MP (Sheng, Zhang et al. 2002, Deng, Ju et al. 2008) notamment avec des prétraitements à de faibles concentrations (1 μ M), et aussi dans certains modèles animaux présentant des déficits cognitifs (Peng, Gao et al. 2015). Nous pouvons souligner que son efficacité peut être due à la présence de l'hydroxytyrosol et de l'acide caféique, puisque ce sont les deux principaux métabolites retrouvés dans le plasma chez les rats après ingestion d'un extrait riche en verbascoside (Quirantes-Piné, Herranz-López et al. 2013). Bien que cette observation puisse souligner l'importance de l'action de plusieurs composés phénoliques combinés, il peut être pertinent de confronter nos résultats du chapitre 2 à l'efficacité de ce composé phénolique.

Par ailleurs, de nombreuses études démontrent le potentiel du resvératrol, un composé phénolique particulièrement présent dans le vin rouge, pour limiter le développement de la MA (Witte, Kerti et al. 2014, Bastianetto, Ménard et al. 2015, Moussa, Hebron et al. 2017, Truong, Jun et al. 2017). Son efficacité pour diminuer le déclin cognitif chez les patients MCI ou atteint de la MA ne s'est pas révélée significative (Zhu, Grossman et al. 2018). Cependant, de par sa structure, ce composé possède des propriétés différentes de ceux étudiés dans ce travail, notamment un caractère lipophile plus important.

L'élaboration d'une formulation efficace est un challenge, mais recroiser les informations sur l'efficacité des composés phénoliques biodisponibles connus pour leurs potentiels antioxydants et neuroprotecteurs *in vivo* semble une voie prometteuse pour développer une formulation non toxique et efficace pour limiter la progression de la mort des neurones à l'origine de la MA et de la MP.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La MA et la MP représentent un problème de santé publique mondiale. Cependant, l'efficacité thérapeutique est toujours absente, à tel point que les autorités publiques françaises ont décidé le 1^{er} août 2018 de ne plus rembourser les médicaments utilisés pour la prise en charge de la MA, faute de bénéfices suffisants. Le développement de stratégies préventives et thérapeutiques efficaces est une urgence réelle pour les patients et les proches des individus malades.

Dans ce travail, en compilant les connaissances actuelles sur l'impact de la nutrition, de l'huile d'olive et des composés phénoliques, nous avons émis l'hypothèse qu'une association judicieuse de composés phénoliques issus de l'huile d'olive pouvait potentialiser leurs effets dans une recherche de traitement pour limiter la neurodégénérescence induite par le stress oxydatif caractéristique de la MA ou de la MP.

Notre premier objectif était d'observer si la combinaison équimolaire de l'oleuropéine, de l'acide *p*-coumarique et du tyrosol (Mix 1), trois composés phénoliques caractéristiques de l'huile d'olive structurellement différents, pouvait potentialiser leurs effets neuroprotecteurs. Pour cela, nous avons mesuré leur réactivité vis-à-vis du radical superoxyde ainsi qu'envers le peroxyde d'hydrogène, deux EROs d'importance dans la génération du stress oxydatif et dans la dégénérescence neuronale. Nos résultats ont montré que bien que leur association n'augmentait pas de façon significative leur capacité à piéger le radical superoxyde, elle permettait d'augmenter la réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. De plus, cette formulation a permis de diminuer de manière importante la concentration en composés phénoliques nécessaire pour observer un effet neuroprotecteur en comparaison des études ayant utilisé ces composés phénoliques individuellement (concentrations efficaces entre 5 et 50 μM). En effet le Mix 1 induit une diminution significative de la mort neuronale induite par le stress oxydatif dès 0,1 μM de Mix1, soit 0,033 μM de chaque composé phénolique. Nous avons observé que l'effet neuroprotecteur passe par une diminution de la production d'EROs intracellulaires associée à une diminution des modifications oxydatives des protéines. L'inhibition du facteur Nf-kB a aussi été observée, ainsi qu'une diminution de l'activation du facteur de régulation rédox Nrf2. Afin de confirmer l'efficacité de cette formulation, des expérimentations *in vivo* seraient pertinentes pour comparer l'efficacité de cette formulation à l'efficacité des composés individuels pour contrecarrer les dommages neuronaux. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre quels étaient les mécanismes impliqués dans la potentialisation de la somme des effets des composés phénoliques du Mix 1. Pour cela, nous avons fait le choix d'observer en premier lieu leur comportement en conditions

oxydatives dans un système simplifié par comparaison à la complexité du système biologique. Nous avons donc comparé les effets de l'oxydation par voie électrochimique sur les composés individuels ou en combinaison. De ce travail ressort trois néocomposés spécifiques de l'oxydation du Mix 1, de m/z 299, 675 résultant de couplages des formes natives et oxydées des composés phénoliques. De plus, nous avons observé que les dimérisations des monophénols n'avaient plus lieu lorsque les trois composés ont été oxydés simultanément, ce qui peut être associé à la régénération de l'oleuropeine dans le Mix1 telle qu'observée dans l'évaluation des taux d'électrolyses. Fait intéressant, nous avons montré que les néocomposés formés au cours de l'électrolyse, et plus particulièrement ceux issus de l'oleuropéine, pouvaient jouer un rôle non négligeable dans la neuroprotection observée du Mix 1 dès 1 nM. Comme évoqué précédemment, la production de ces composés en quantités plus importantes serait un atout pour faciliter leur identification. De plus, leur purification permettrait d'observer leurs propriétés biologiques individuelles et de caractériser plus clairement leurs rôles dans la neuroprotection observée de notre formulation. Par ailleurs, dans ce travail nous avons analysé les produits stables issus de l'oxydation du Mix 1. Il serait intéressant d'utiliser un appareillage en ligne d'électrochimie-LC-UV-Vis-ESI-MS² afin d'observer *in situ* la formation de composés moins stables que ceux que nous avons générés. Enfin, l'utilisation d'autres méthodes d'oxydation, comme par la réaction de Fenton, pour observer les produits générés lors de l'oxydation du Mix 1 serait intéressante d'une part pour comparer les produits générés, et d'autre part pour rechercher ces produits dans un contexte de stress oxydatif.

En effet, dans un troisième temps, nous avons souhaité évaluer la transformation de ces composés phénoliques d'un point de vue métabolique et d'un point de vue oxydatif dans un modèle de cellules neuronales en conditions oxydatives. Nous avons pu observer la sulfatation du tyrosol dans nos conditions de culture, mais n'avons pas été en mesure d'observer d'autres métabolites. Néanmoins, nous avons montré que l'oleuropéine, le tyrosol et l'acide *p*-coumarique étaient internalisés et accumulés, du moins durant les premières heures de traitement, par les cellules neuronales soumises à un stress oxydatif et pouvait traverser une monocouche de cellules épithéliales sous leurs formes natives. Afin de continuer ce travail, la reproduction des résultats sur le modèle de BHE est primordiale. De plus, observer les métabolites à l'intérieur des cellules épithéliales permettrait d'obtenir des informations sur le métabolisme cellule-spécifique de ces composés phénoliques. Enfin, l'amélioration de notre méthode de purification et l'utilisation d'un modèle cellulaire neuronale plus complexe que les cellules SK-N-SH, par exemple des cellules primaires de souris ou encore mieux, des cellules souches pluripotentes d'origine

humaine différenciées en neurones, peuvent être intéressantes pour évaluer plus spécifiquement la métabolisation de ces composés phénoliques.

Pris dans leur ensemble, ces résultats renforcent l'idée de recourir à des formulations stratégiques de composés phénoliques afin d'intervenir plus efficacement dans la lutte contre la neurodégénérescence à l'origine du déclin cognitif caractéristique de la MA et de la MP. Nous pouvons souligner l'incidence des composés phénoliques sur la régulation du stress oxydatif neuronal même à de faibles concentrations. Ces effets sont attribuables d'une part aux effets antioxydants des composés phénoliques natifs, mais aussi aux réactions intra et intermoléculaires comme celles générées lors de l'oxydation du Mix 1. L'activité antioxydante des composés phénoliques passe en effet par la production d'intermédiaires réactionnels et de métabolites oxydés possédant de potentiels effets biologiques. Malgré la difficulté de séparer l'activité biologique due aux composés phénoliques natifs de celle due aux métabolites issus de leur oxydation, plusieurs études suggèrent qu'ils possèdent un rôle à jouer. Par conséquent, leurs effets peuvent être le résultat de la combinaison des composés phénoliques natifs et des métabolites issus de leur oxydation et de leur transformation métabolique. Notre travail confirme qu'un effet neuroprotecteur est possible et ouvre la voie à de nouvelles approches dans le développement de médication efficace dans le traitement du stress oxydatif au niveau cérébral.

Afin de résumer les différents travaux proposés dans les derniers paragraphes en vue d'approfondir ce travail, une des premières perspectives serait de démontrer l'efficacité du Mix 1 *in vivo* dans un contexte de neurodégénération. De plus, afin d'observer la formation des métabolites issus de l'oxydation des composés phénoliques dans un contexte biologique, il serait pertinent d'utiliser un modèle cellulaire plus complexe, par exemple des neurones primaires et d'améliorer la méthode et le rendement des extractions. De même, une étude métabolomique non ciblée pour observer les effets des composés phénoliques en conditions natives et en conditions de stress oxydatif peut-être instructive sur les effets du Mix 1 sur les composants cellulaires.

Dans le but de continuer le travail de caractérisation des composés issus de l'oxydation des composés phénoliques, l'utilisation de l'électrochimie-LC-UV-Vis-ESI-MS² *in situ* peu être pertinente pour évaluer les produits peu stables, et l'utilisation des techniques RMN peuvent être employées pour déterminer la structure exacte des composés stables.

ANNEXE I

Tableau 20 : Phenolic compounds found in olive oil and olive oil oxidized or process wastes.

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H]	Product ions	Identification medium	
Tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	276	137	93	In olive oil In wastes generated by olive oil storage	[1] [2]
Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃		151.04	123, 108	In olive oil wastes (pomace and pulpe) In wastes generated by olive oil storage	[2, 3]
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	228/230	151.04	123	In Olive oil In wastes generated by olive oil storage	[1] [2]
Hydroxytyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₃	232/280	153	123	In Olive oil In wastes generated by olive oil storage	[1] [2, 4]
Unknown	C ₉ H ₁₄ O ₂		153.09	123, 151	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₇ H ₁₀ O ₄	-	157,05	69, 139	In wastes generated by olive oil storage	[2]
<i>p</i> -coumaric acid		298 / 310	163	119	In olive oil	[1]
Vanillic acid		-	167	(hidden by background)	In olive oil	[1]
3,4-Dihydroxyphenylglycol (= hydroxytyrosol hydroxylated)	C ₈ H ₁₀ O ₄		169	-	Following Thermal treatment between 50 and 90 °C of olive oil wastes	[5]
Acid elenolic Derivative : Closed ring Decarboxilated Aldehydic form		-	183	-	In olive oil	[1]
Acid elenolic Derivative : Closed ring Decarboxilated form Dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid		-	183	-	In olive oil	[1]
	C ₉ H ₁₂ O ₄	230	183.06	213	In olive oil In wastes generated by olive oil storage	[2] [1]
Unknown	C ₁₀ H ₁₈ O ₆	-	185.11	95, 111, 139	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	-	191.05	103	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Hydroxylated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₉ H ₁₂ O ₅		199.061	155	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Hydrated product of the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₉ H ₁₄ O ₅		201.07	157	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Decarboxylated form of hydroxy elenolic acid	C ₁₀ H ₁₄ O ₅		213.07	169	In wastes generated by olive oil storage	[2]

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H]	Product ions	Identification medium	
Aldehydic form of decarboxymethyl elenolic acid	C ₁₀ H ₁₆ O ₅		215.09	171/197	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Acid elenolic Derivative : Open ring Decarboxilated Aldehydic form		-	215	-	In olive oil	[1]
Unknown	C ₉ H ₁₄ O ₆	-	217.07	173, 199	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Cinamic acid		-	220	-	In oxidized olive oil	[4]
Acid elenolic Derivative : Closed ring carboxilade Aldehydic form		-	241	-	In olive oil	[1]
Acid elenolic Derivative : Closed ring carboxilade form		-	241	-	In olive oil	[1]
Acid elenolic Derivative : Open ring carboxilade form		-	241	-	In olive oil	[1]
Unknown	C ₁₁ H ₁₆ O ₆		243.08	123, 211	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₁₁ H ₁₆ O ₆		243.08	123, 211	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	254/348	285.04	175, 151	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Hydroxylated form of elenolic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₆	280/320	257.06	213	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆		257.10	167, 211	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆		257.10	167, 211	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	268/338	269.04	225, 151	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Acid elenolic Derivative : Closed ring carboxilade Hydroxilade form		-	273	-	In olive oil	[1]
Luteolin		-	285	133, 199, 107, 175, 217,	In olive oil	[1]
methoxyluteolin		-	299	199, 191, 227	In olive oil	[1]

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H]	Product ions	Identification medium	
Aldehydic form of Ligstroside derivative Decarboxilated : Closed ring		-	303	-	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative : Closed ring Decarboxilated form		-	303	-	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative : Open ring Decarboxilated form		-	303	-	In olive oil	[1]
Dialdehydic form of decarboxymethyl ligstroside aglycone		-	303	287, 167	121, In oxidized olive oil	[4]
Hydroxytyrosol-1- β -Glucoside			315	153, 179,	135, In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Unknown	$C_{17}H_{18}O_6$		317.10	287	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Decarboxymethyl oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_6$	230/280	319.11	195, 183	In olive oil In wastes generated by olive oil storage	[2] [1]
Oleuropein derivative		-	319	199, 153	111, In olive oil	[1]
Oleuropein derivative : Open ring Decarboxilated form		-	319	-	In olive oil	[1]
Dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycone		-	319	303, 167	137, In oxidized olive oil	[4]
Ligstroside derivative		-	335	199, 155	111, In olive oil	[1]
Ligstroside derivative : Open ring Decarboxilated Aldehydic form		-	335	-	In olive oil	[1]
Hydroxylated form of decarboxymethyl oleuropein aglycone	$C_{17}H_{20}O_7$	- 230/280	335.11	199	In wastes generated by olive oil storage. In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[2] [3]

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Identification medium		
Oxidation product of the dialdehydic form of decarboxymethyl oleuropein aglycone		-	335	319, 183	137,	In oxidized olive oil	[4]
Oleuropein derivative : Open ring Decarboxilated Aldehydic form		-	351	-		In olive oil	[1]
Caffeoyl-quinic acid			353	191, 161	179,	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Ligstroside derivative : Closed ring carboxilade Aldehydic form		-	361	-		In olive oil	[1]
Ligstroside derivative : Closed ring carboxilade form		-	361	-		In olive oil	[1]
Ligstroside derivative		-	361	291, 101, 138	259, 127,	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative		-	361	291, 259, 139	101, 127,	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative : Open ring carboxilade form		-	361	-		In olive oil	[1]
Aldehydic form of ligstroside aglycone		-	361	345, 225	121,	In oxidized olive oil	[4]
Oleuropein derivative		-	365	229, 138	153,	In olive oil	[1]
Unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈		375.10	311, 333		In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈		375.10	299, 343		In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown	C ₁₉ H ₂₀ O ₈		375.10	299, 343		In wastes generated by olive oil storage	[2]
Oleuropein aglycone derivative			377	197, 153	179,	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]

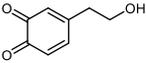
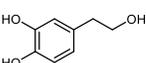
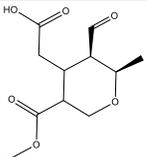
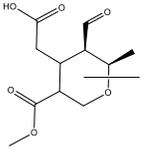
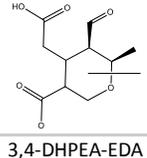
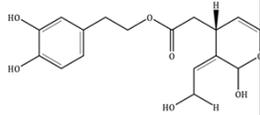
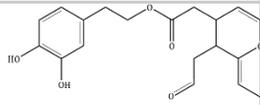
ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H]	Product ions	Identification medium	
Oleuropein aglycone or isomer (a)	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	236/282	377.12	307, 275	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Oleuropein aglycone or isomer (b)	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	236/282	377.12	307, 275	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Oleuropein derivative : Closed ring carboxilade Aldehydic form		-	377	-	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative : Closed ring carboxilade form		-	377	-	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative		-	377	307, 275, 139, 111	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative		-	377	275, 307, 139, 111	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative		-	377	275, 307, 139, 111	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative		-	377	275, 307, 333, 301, 181	In olive oil	[1]
Oleuropein derivative : Open ring carboxilade form		-	377	-	In olive oil	[1]
Aldehydic form of oleuropein aglycone		-	377	361, 137, 225	In oxidized olive oil	[4]
Oxidation product of the aldehydic form of ligstroside aglycone		-	377	361, 121, 241	In oxidized olive oil	[4]
Unknown	C ₁₂ H ₁₈ O ₆		379.13	167, 211, 243	In wastes generated by olive oil storage	[2]
Hydroxytyrosyl acyclodihydroelenolate		219 / 279	381	151, 153, 121, 215, 227, 245	In olive mill wastes	[6]
Oleoside			389	345, 209	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Ligstroside derivative : Closed ring Carboxilade form		-	393	-	In olive oil	[1]

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H]	Product ions	Identification medium		
Ligstroside derivative		-	393	317, 349	257,	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative		-	393	317, 257	349,	In olive oil	[1]
Ligstroside derivative		-	393	317, 257	349,	In olive oil	[1]
Oxidation product of the aldehydic form of oleuropein aglycone		-	393	377, 241	137,	In oxidized olive oil	[4]
11-Methyl-oleoside			403			In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Unknown	C ₂₀ H ₂₄ O ₉		407.13	273		In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown			407	389, 357, 161	375, 313,	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Oleuropein derivative Closed ring Carboxilade form		-	409	-		In olive oil	[1]
Oleuropein derivative Closed ring carboxilade Hydroxilade form		-	409	-		In olive oil	[1]
Acetoxypinoresinol	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	236/280	415.14	151		In wastes generated by olive oil storage	[2]
Unknown			421	389, 239, 195	241, 165,	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Luteolin-7-glucoside			447	285		In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
6' <i>p</i> -coumaroylsecologanoside		225 / 309	535	145, 265	163,	In olive mill wastes In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[6] [3]
Unknown			551	507, 532, 281	341, 389,	In olive mill wastes In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Ligstroside derivative		-	553	137, 181, 341	257, 109,	In olive oil	[1]
Unknown			555	537, 393	403,	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]

ID (metabolite)	Formula	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Identification medium	
Unknown			579	337, 561, 547, 529	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Luteolin-7-rutinoside			593	447, 285	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Luteolin-7-rutinoside isomer			593	447, 285	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Unknown			595	-	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Rutine			609	301, 179	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Verbascoside			623	461, 135, 315, 161, 297	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Unknown			663	479, 295	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Oleuropein glucoside			701	539, 307, 377	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Unknown			763	565, 341	In olive oil wastes (pomace and pulpe)	[3]
Oleuropein dimer		-	1075	-	In olive oil wastes (pomace)	[7]
Oleuropein trimers - two covalent bonds			1613	1209, 1581, 1451, 1419, 1227, 1073	In olive oil wastes (pomace)	[7]
Oleuropein tetramère		-	2153	-	In olive oil wastes (pomace)	[7]
Oleuropein pentamer		-	2691	-	In olive oil wastes (pomace)	[7]

1. de la Torre-Carbot, K., et al. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(11): p. 4331-40.
2. Lozano-Sánchez, J., et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(21): p. 11491-11500.
3. Cardoso Susana, M., et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004. **85**(1): p. 21-32.
4. Ríos, J.J., M.J. Gil, and F. Gutiérrez-Rosales *Journal of Chromatography A*, 2005. **1093**(1-2): p. 167-176.
5. Rodríguez, G., et al. *LWT - Food Science and Technology*, 2009. **42**(2): p. 483-490.
6. Obied, H.K., et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(8): p. 2848-2853.
7. Cardoso, S.M., et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006. **86**(10): p. 1495-1502.

Tableau 21 : Oxidation products of oleuropein

ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods	
Hydroxytyrosol quinone	C ₈ H ₆ O ₃		-	151.0388	123, 136	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Hydroxytyrosol 2[H] (Oxidized/solvent adducts)	C ₈ H ₈ O ₃		-	153	123, 119, 137	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Elenolic acid	C ₁₁ H ₁₄ O ₆		-	241,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Elenolic acid + [H ₂ O] (Oxidized/solvent adducts)	C ₁₁ H ₁₆ O ₇		-	259,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Elenolic acid + EtOH (Oxidized/solvent adducts)	C ₁₃ H ₂₀ O ₇		-	287,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone + [H]-[C ₂ H ₅ O ₂]	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	3,4-DHPEA-EDA or 3,4-DHPEA-DEDA From (Obied, Prenzler et al. 2008)	-	319,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone + [O] - [C ₂ H ₅ O ₂]	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	 From (Zafiris, Benetti et al. 2018)	-	335,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone - [CO]	C ₁₈ H ₂₂ O ₇		-	349,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone	C ₁₉ H ₂₂ O ₈		-	377,1	307, 275, 241	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone - 2[H] + [O]	C ₁₉ H ₂₀ O ₉		-	391,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone + [H ₂ O]	C ₁₉ H ₂₄ O ₉		-	395,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone - 2[H] + [O] + [H ₂ O]	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₀		-	409,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Elenolic acid glycoside + [H ₂ O]	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₂		-	421,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)

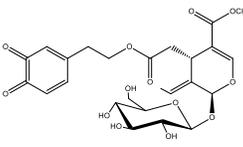
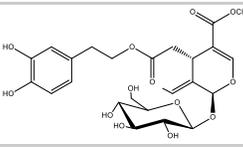
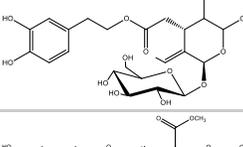
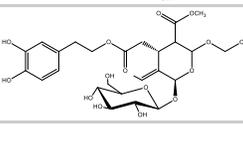
ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods	
Oleuropein aglycone + [EtOH]	C21H29O9		-	423,2		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein aglycone - 2[H] + [O] + [EtOH]	C21H26O10		-	437,1		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Elenolic acid glycoside + [EtOH]	C19H30O12		-	449,2		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein + [H] - [C ₂ H ₃ O ₂]	C23H30O11		-	481,2		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein - [CO] + 2[H]	C24H34O11		-	513,2		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein Oxidation product	-		weak	537		Periodate oxidation Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂)	(Antolovich, Bedgood et al. 2004)
Oleuropein quinone	C25H30O13		240/392	537		Periodate oxidation UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Antolovich, Bedgood et al. 2004) (Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein quinone isomer (glucose oxidation?)	-		237/393	537		Periodate oxidation	(Antolovich, Bedgood et al. 2004)
Oleuropein - [H]	C25H31O13		-	538,2		UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein	C25H32O13		-	539,2	275, 307, 377, 223	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein + [H ₂ O]	C25H34O13		-	557,2	513, 377, 241	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein + [EtOH]	C27H38O14		-	585,2	405, 553, 507	UV Radiation (λ max = 254 nm)	(Longo, Morozova et al. 2017)
Oleuropein Oxidation product	-		232/280/327	679	-	Periodate oxidation	(Antolovich, Bedgood et al. 2004)
Oleuropein Oxidation product	-		234/280/329	679	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂)	(Antolovich, Bedgood et al. 2004)
Oleuropein dimer	-		-	1077	-	Autooxidation (under O ₂)	(Gentile, Uccella et al. 2017)

Tableau 22 : Oxidation products of *p*-coumaric acid

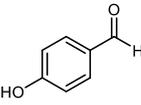
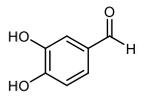
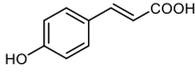
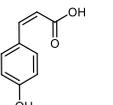
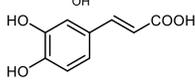
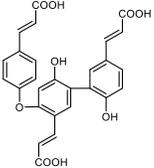
ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods
4-Hydroxy-benzaldehyde	C ₇ H ₆ O		281	121	-	Periodate oxidation Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) (Antolovich, Bedgood et al. 2004)
3,4 Dihydroxy-benzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₃		228/27 9 /310	137	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) (Antolovich, Bedgood et al. 2004)
<i>trans-p</i> -Coumaric acid	-		298 / 310	163	119	AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005)
<i>cis-p</i> -Coumaric acid	-		-	163	-	photoisomerization (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄		240/30 3 /323	179	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) (Antolovich, Bedgood et al. 2004)
-	-	-	320	281	237, 143, 93	AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005)
<i>p</i> -Coumaric acid dimer	-	Cf table 2	304	325	281, 237, 219, 163	AAPH (pH 7.4) Biomimetic catalysis (iron-porphyrin/H ₂ O ₂) (Roche, Dufour et al. 2005) (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)
Isomer <i>p</i> -Coumaric acid dimer	-	Cf table 2	298/31 6	325	281, 179	AAPH (pH 7.4) (Roche, Dufour et al. 2005)
<i>p</i> -Coumaric acid dilactone dimer	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	Cf table 2	weak	325	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) (Antolovich, Bedgood et al. 2004)
<i>p</i> -Coumaric acid dimer derivative	-	-	-	325	281, 255, 237	Enzymatic oxidation (Laccase pH 5) (Chakroun, Bouaziz et al. 2012) (Katase and Bollag 1991)
<i>p</i> -Coumaric acid trimer	-	-	298/31 5	443	399, 355, 279	- (Roche, Dufour et al. 2005)
-	-		302	487	443	AAPH (pH 7.4) Biomimetic catalysis (iron-porphyrin/H ₂ O ₂) (Roche, Dufour et al. 2005) (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)
Radical coupled derivative products	-	-	-	613	-	Biomimetic catalysis (iron-porphyrin/H ₂ O ₂) (Šmejkalová, Piccolo et al. 2006)

Tableau 23 : Oxidation products of tyrosol

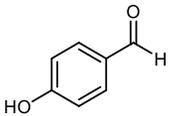
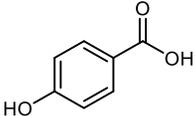
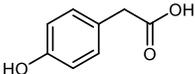
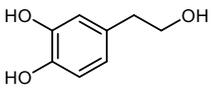
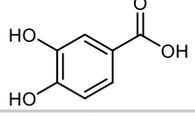
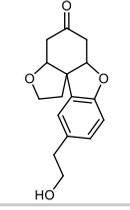
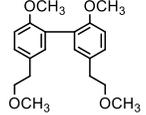
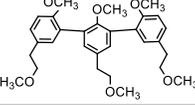
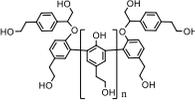
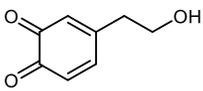
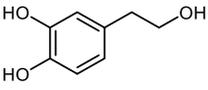
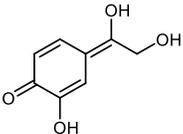
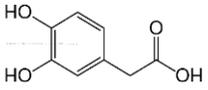
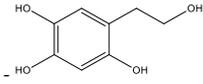
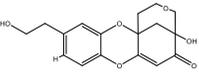
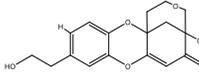
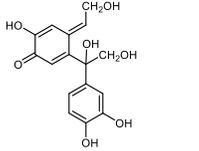
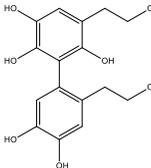
ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods	
4-Hydroxy-benzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂		281	121	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂)	(Antolovich, Bedgood et al. 2004)
4-Hydroxy-benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃					Electro-Fenton process	(Ammar, Oturan et al. 2015)
4-Hydroxy-phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃		-	151	-	Electro-Fenton process	(Ammar, Oturan et al. 2015)
Hydroxytyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₃		280	153	-	Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂) Electro-Fenton process	(Antolovich, Bedgood et al. 2004, Di Maio, Esposito et al. 2011, Ammar, Oturan et al. 2015)
3,4-Dihydroxy-benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄		-	153	-	Electro-Fenton process	(Ammar, Oturan et al. 2015)
Tyrosol dimer : dimeric tetracyclic ketone.	C ₁₆ H ₁₈ O ₄		277	273	255, 243, 228	Enzymatic oxidation (laccase pH 5)	(Chakroun, Bouaziz et al. 2012, Chakroun, Bouaziz et al. 2013)
Dimer of quinone-tyrosol	-	-	217/26 7 /435	288	151, 137	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Dimer of quinone	-	-	208/26 0 /346	303	302, 284, 272, 254, 223, 162, 151, 122	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5) Fenton (Fe ²⁺ /EDTA/H ₂ O ₂)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Tyrosol acetylated dimer	C ₂₀ H ₂₆ O ₄		-	441	-	Amonium nitrate oxidation and acetylation (Ac ₂ O/Pyridine)	(Antenucci, Panzella et al. 2016)
Tyrosol acetylated trimer	C ₃₀ H ₃₈ O ₆		-	661	-	Amonium nitrate oxidation and acetylation (Ac ₂ O/Pyridine)	(Antenucci, Panzella et al. 2016)
Tyrosol oligomers (linear polymerisation)			-	> 2000	136	Enzymatic oxidation (peroxydase (Antenucci, Panzella et al. 2016) pH 6.8)	(Antenucci, Panzella et al. 2016)

Tableau 24 : Oxidation products of hydroxytyrosol

ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods	
Hydroxytyrosol quinone	C ₈ H ₈ O ₃		217/254 /400	151	133, 123, 122	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ Enzymatic oxidation oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Hydroxytyrosol (3,4 DHPEA)	C ₈ H ₁₀ O ₃		219/278	153	153, 123	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Unknown	-	-	Weak	163	-	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	(Roche, Dufour et al. 2005)
Oxidized and hydrated Hydroxytyrosol - 2H	-		268/388	167	149, 137	AAPH (PH 7.4)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
3,4-Dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC)	C ₈ H ₈ O ₄		217/280	167	167, 149, 143	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ (IS confirmation)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Unknown	-	-	218/282	167	167, 149, 139, 123, 109, 93	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Oxidation product of hydroxytyrosol	-	-	224/278	169	151 (-H ₂ O), 123 (-CH ₂ CH ₂ O)	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ Enzymatic oxidation oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)

ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods	
Hydroxylated Hydroxytyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₇		-	169	-	Enzymatic oxidation oxidation (peroxydase H ₂ O ₂ pH 7.4)	(De Lucia, Panzella et al. 2006)
Unknown	-	-	219/278 /326	207	-	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Oxidation product of 3,4-DHPEA	-	-	weak	217	-	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Hydroxytyrossol dimer	-	-	272 /442	303	267, 239, 219, 183	AAPH (PH 7.4)	(Roché, Dufour et al. 2005)
Dimer of quinone-quinone	-	-	208/260 /346	303	302, 284, 272, 254, 223, 162, 151, 122	Enzymatic oxidation oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
<i>Iso</i> -Dimer of quinone-quinone	-	-	210/262 /343	303	302, 284, 272, 254, 223, 162, 151, 122	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Dimer of Hydroxytyrosol quinone	-	-	218/255 /289	303	153, 151, 123	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)
Unknown	-	-	219/319 /385	304	-	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 5)	(Di Maio, Esposito et al. 2011)

ID (metabolite)	Formula	Structure	λ max	[M-H] ⁻	Product ions	Oxidation Methods
Regioisomeric hydroxytyrosol dimer <i>a</i>	-		-	304	+	Enzymatic oxidation (tyrosinase pH 7.4)
Regioisomeric hydroxytyrosol dimer <i>d</i>	-		-	304	+	Enzymatic oxidation (tyrosinase, pH 7.4)
-(AH) ₂ + H ₂ O - 2H	-		272/414	319	289, 241	AAPH (PH 7.4)
Penta-hydroxybiphenyl	C ₁₆ H ₁₈ O ₇		-	321	-	Enzymatic oxidation (peroxydase H ₂ O ₂ pH 7.4)
Hydroxytyrosol dimer and quinone	-	-	322/380	455	303, 273	AAPH (PH 7.4)
Unknown	-	-	218 / 249 / 439	605	-	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂
Unknown	-	-	weak	649	-	Fenton Fe ²⁺ /H ₂ O ₂

1. Longo E, Morozova K, Scampicchio M. Effect of light irradiation on the antioxidant stability of oleuropein. *Food Chem.* 2017;237:91-7.

2. Obied HK, Prenzler PD, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposito S, et al. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat Prod Rep.* 2008;25(6):1167-79.

3. Zafiris E, Benetti N, Liang J, Bonvino NP, Karagiannis TC, Hung A, et al. OliveNet™: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*. *Database.* 2018;2018.

4. Antolovich M, Bedgood DR, Jr., Bishop AG, Jardine D, Prenzler PD, Robards K. LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem.* 2004;52(4):962-71.
5. Gentile L, Uccella NA, Sivakumar G. Soft-MS and Computational Mapping of Oleuropein. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
6. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Biomol Chem.* 2005;3(3):423-30.
7. Šmejkalová D, Piccolo A, Spiteller M. Oligomerization of Humic Phenolic Monomers by Oxidative Coupling under Biomimetic Catalysis. *Environmental Science & Technology.* 2006;40(22):6955-62.
8. Chakroun H, Bouaziz M, Dhouib A, Sayadi S. Enzymatic oxidative transformation of phenols by *Trametes trogii* laccases. *Environ Technol.* 2012;33(16-18):1977-85.
9. Katase T, Bollag J-M. TRANSFORMATION OF TRANS-4-HYDROXYCINNAMIC ACID BY A LACCASE OF THE FUNGUS *TRAMETES VERSICOLOR*: ITS SIGNIFICANCE IN HUMIFICATION. *Soil Science.* 1991;151(4).
10. Ammar S, Oturan MA, Labiadh L, Guersalli A, Abdelhedi R, Oturan N, et al. Degradation of tyrosol by a novel electro-Fenton process using pyrite as heterogeneous source of iron catalyst. *Water Res.* 2015;74:77-87.
11. Di Maio I, Esposito S, Taticchi A, Selvaggini R, Veneziani G, Urbani S, et al. HPLC–ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil. *Food Chemistry.* 2011;125(1):21-8.
12. Chakroun H, Bouaziz M, Yangui T, Blibech I, Dhouib A, Sayadi S. Enzymatic transformation of tyrosol by *Trametes trogii* laccases: Identification of the product and study of its biological activities. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2013;87:11-7.
13. Antenucci S, Panzella L, Farina H, Ortenzi MA, Caneva E, Martinotti S, et al. Powering tyrosol antioxidant capacity and osteogenic activity by biocatalytic polymerization. *RSC Advances.* 2016;6(4):2993-3002.
14. De Lucia M, Panzella L, Pezzella A, Napolitano A, d'Ischia M. Oxidative chemistry of the natural antioxidant hydroxytyrosol: hydrogen peroxide-dependent hydroxylation and hydroxyquinone/o-quinone coupling pathways. *Tetrahedron.* 2006;62(6):1273-8.
15. Vogna D, Pezzella A, Panzella L, Napolitano A, d'Ischia M. Oxidative chemistry of hydroxytyrosol: isolation and characterisation of novel methanooxocinobenzodioxinone derivatives. *Tetrahedron Letters.* 2003;44(45):8289-92.

ANNEXE II

Expressions mathématiques du courant en fonction du potentiel

Considérons un composé appartenant à un système oxydant/réducteur en solution. La loi de Nernst définit un potentiel d'équilibre E_{eq} associé à ce couple. La réaction électrochimique se produit lorsqu'on amène l'électrode à un potentiel différent du potentiel d'équilibre (surpotentiel d'électrode $\eta = E - E_{eq}$). Il y a alors évolution vers un nouvel état d'équilibre en modifiant les concentrations d'oxydant et/ou de réducteur. Le sens du courant dépend de la valeur du potentiel imposé à l'électrode de travail par rapport à l'électrode référence : le surpotentiel η apparaît comme un facteur de production des réactions électrochimiques. Ce surpotentiel peut être relié au potentiel formel par la loi de Nernst (dans l'Eq 29, on assimile activité à concentration).

$$\eta = E - E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}^{sol}}{C_{Red}^{sol}} \quad \text{Eq 29}$$

où E° représente le potentiel standard du couple Ox/Red, R la constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T la température absolue (en K), n le nombre d'électrons échangés au cours du transfert électronique, F la constante de Faraday ($F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$), C_{Ox} et C_{red} les concentrations des espèces Ox et Red.

La production d'une réaction électrochimique obéit à la Loi de Faraday (Eq 30).

$$N_{Ox} = N_{Red} = \frac{Q}{nF} \quad \text{Eq 30}$$

où Q représente la charge globale qui passe exprimée en Coulomb, N le nombre de moles électrolysées, F la constante de Faraday (charge d'une mole d'électron soit $96584 \text{ C. mol}^{-1}$), n le nombre d'électron nécessaire au changement d'état redox.

Les équations de Randles-Sevcik, qui dérivent de la relation de Butler-Volmer, permettent d'exprimer le courant. Dans le cas d'un système réversible, la cinétique de transfert d'électron est rapide et la diffusion est le facteur limitant de la réaction électrochimique. Le courant de pic s'exprime par les équations 3 (Eq 31) et 4 (Eq 32).

$$I_p = 0.4463 n^{3/2} F A C v^{1/2} D^{1/2} \frac{F^{1/2}}{(RT)^{1/2}}$$

- Eq 31**
- A aire de l'électrode (cm²)
 - I intensité du courant (A)
 - C concentration (mol.cm⁻³)
 - D coefficient de diffusion (cm².s⁻¹)
 - F constante de Faraday (F = 96484 C.mol⁻¹)
 - Expression à 25°C
 - v vitesse de balayage (V.s⁻¹)
 - R constante des gaz parfaits
 - T température (K)

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

- Eq 32** Expression à 25°C

Dans le cas d'un système irréversible, la cinétique de transfert d'électron est lente et le courant est gouverné par cette cinétique. L'expression du courant de pic s'exprime alors par l'équation 5 (Eq 33).

$$I_p = 0.4958 n (a n_a)^{1/2} F A C v^{1/2} D^{1/2} \frac{F^{1/2}}{(RT)^{1/2}}$$

- Eq 33**
- n nombre total d'électrons échangés
 - n_a nombre d'électrons mis en jeu au cours de l'étape cinétiquement déterminante

$$\alpha = \frac{1.857 RT}{\Delta E_{p/2} F n_a}$$

- α coefficient du transfert de charge
- (E_{p/2} valeur pour I = I_{p/2})

$$\Delta E_{p/2} = E_{p/2} - E_p$$

ANNEXE III-A

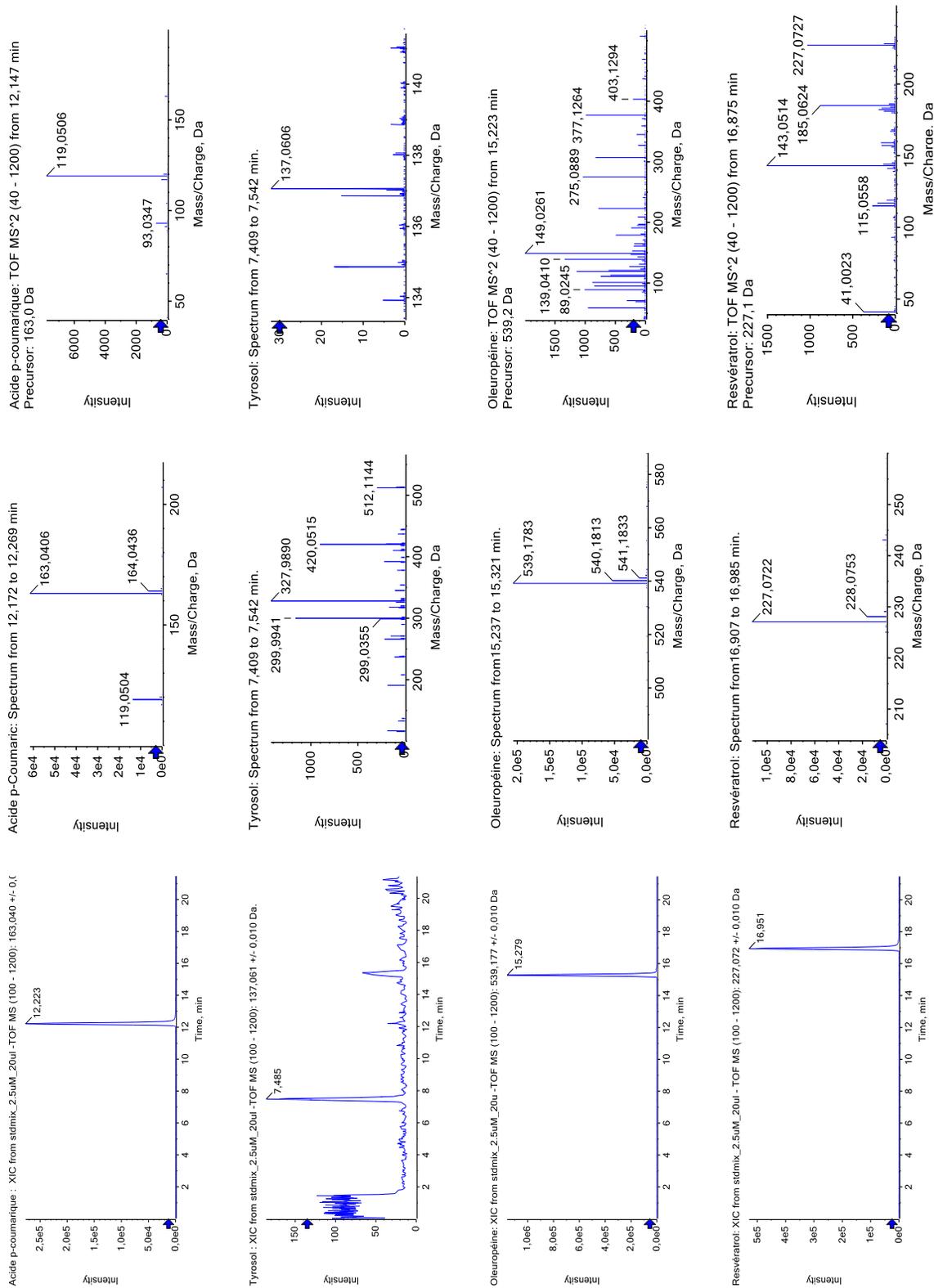


Figure 45 : Profil LC-HRMS/MS des standards de l'oleuropeine, du tyrosol et de l'acide p-coumarique.

ANNEXE III-B

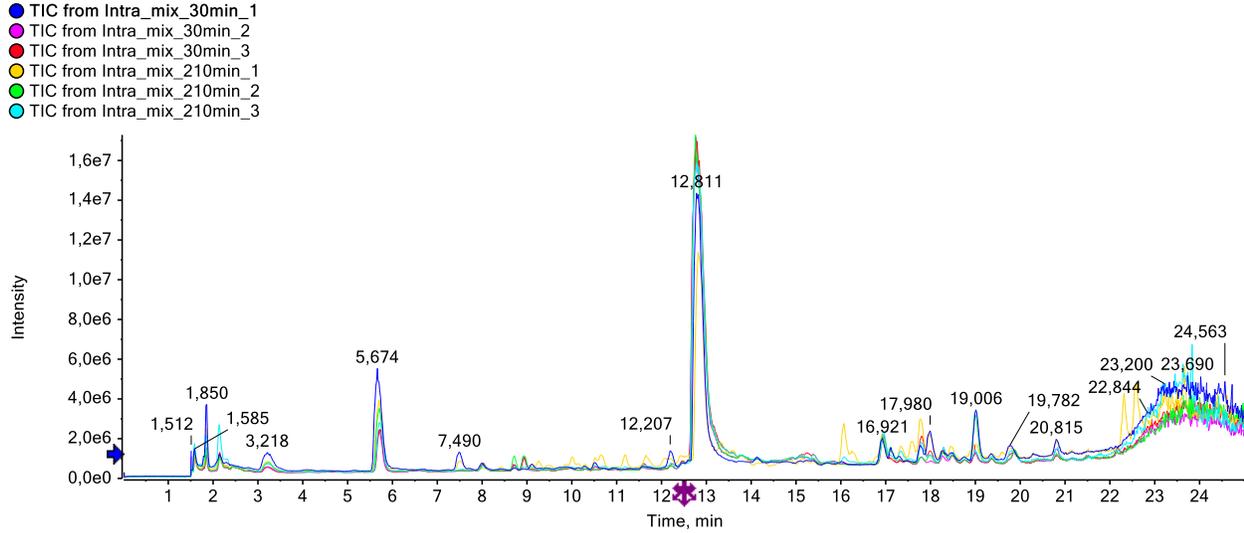


Figure 46 : Comparaison des Total Ion Current (TIC) des extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitement avec les composés phénoliques 1 µM.

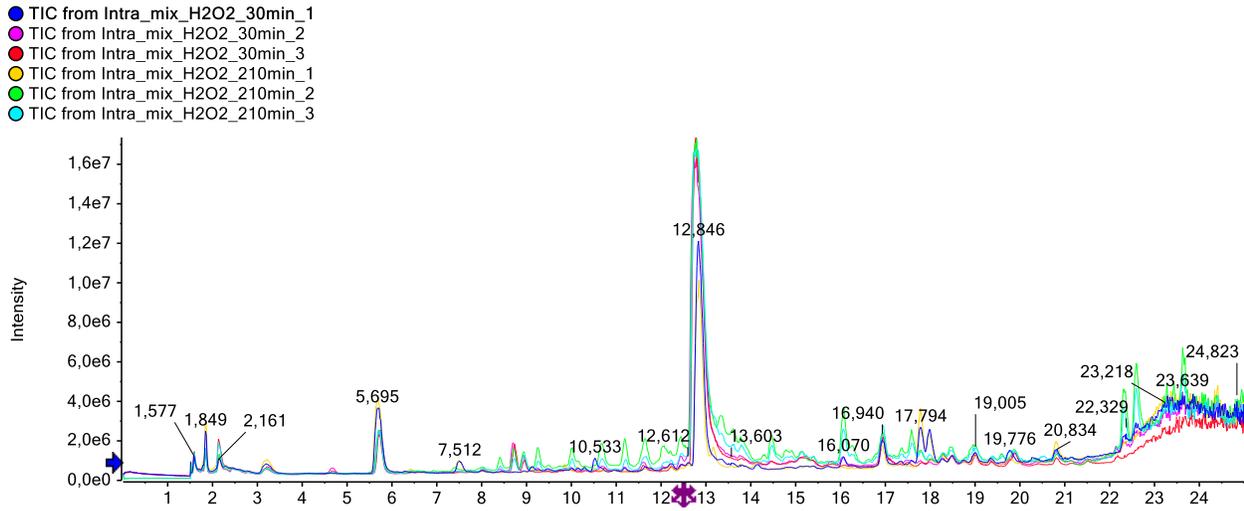


Figure 47 : Comparaison des Total Ion Current (TIC) des extraits intracellulaires après 30 et 210 min de traitement avec les composés phénoliques 1 µM et le H₂O₂ 200 µM.

ANNEXE III-C

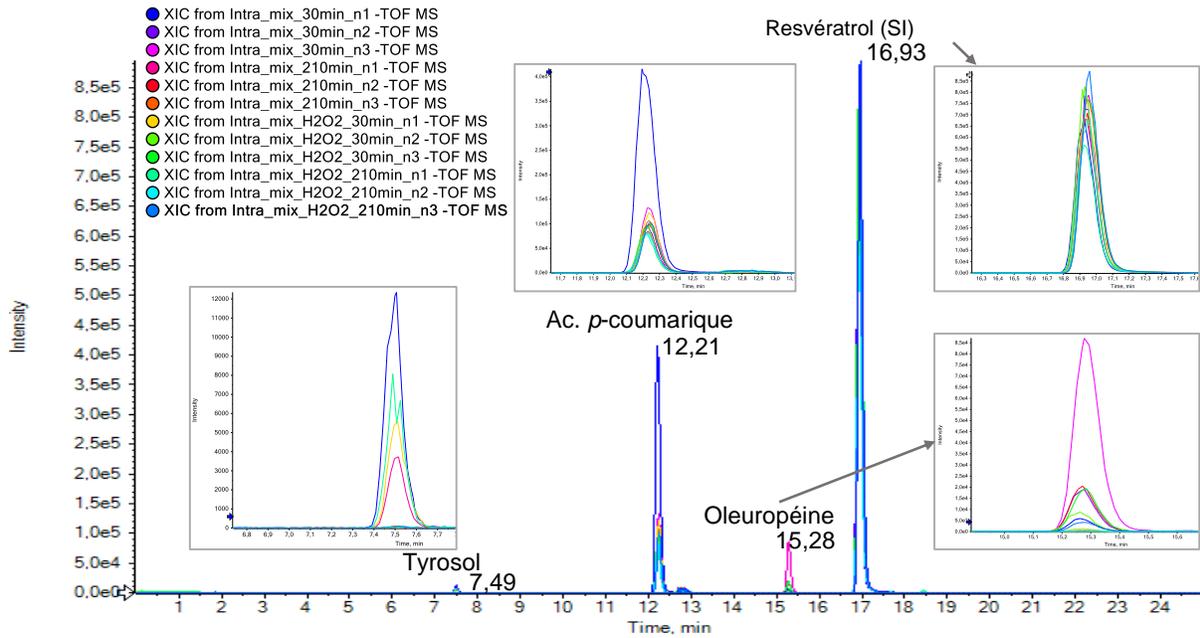


Figure 49 : XIC des composés phénoliques d'intérêt et du standard interne présents dans les extraits intracellulaires.

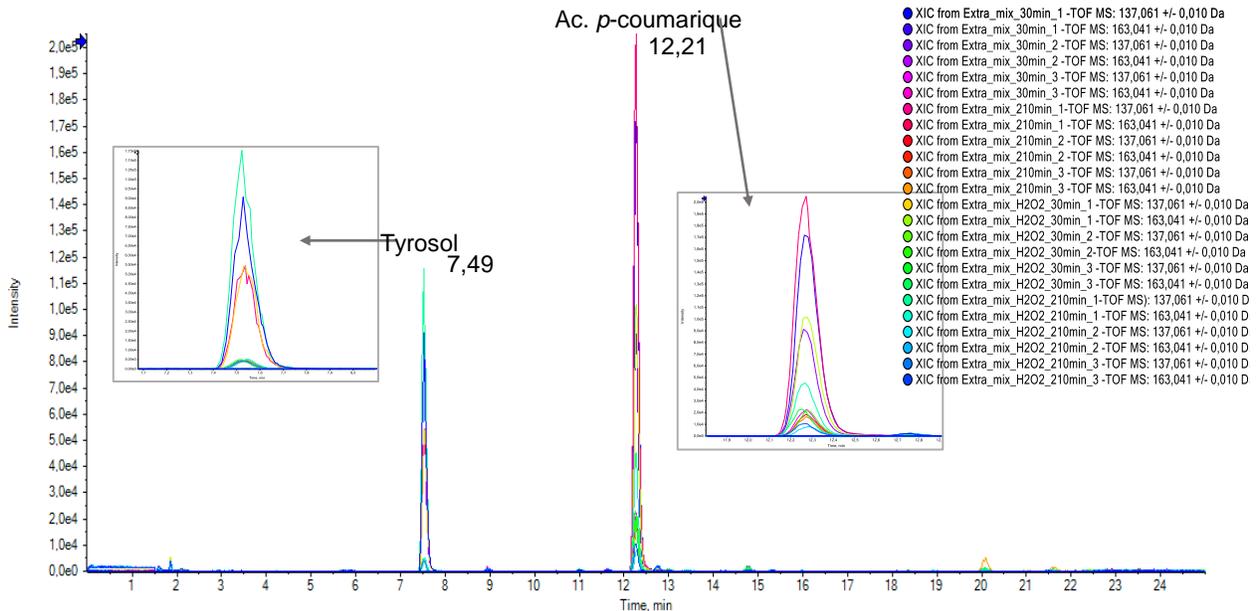


Figure 48 : XIC des composés phénoliques d'intérêt et du standard interne présents dans les milieux extracellulaires.

(Les XIC de l'oleuropéine et du resvératrol ont aussi été générés sur cette représentation, mais leur absence dans les milieux extracellulaires les rend invisibles).

ANNEXE III-D

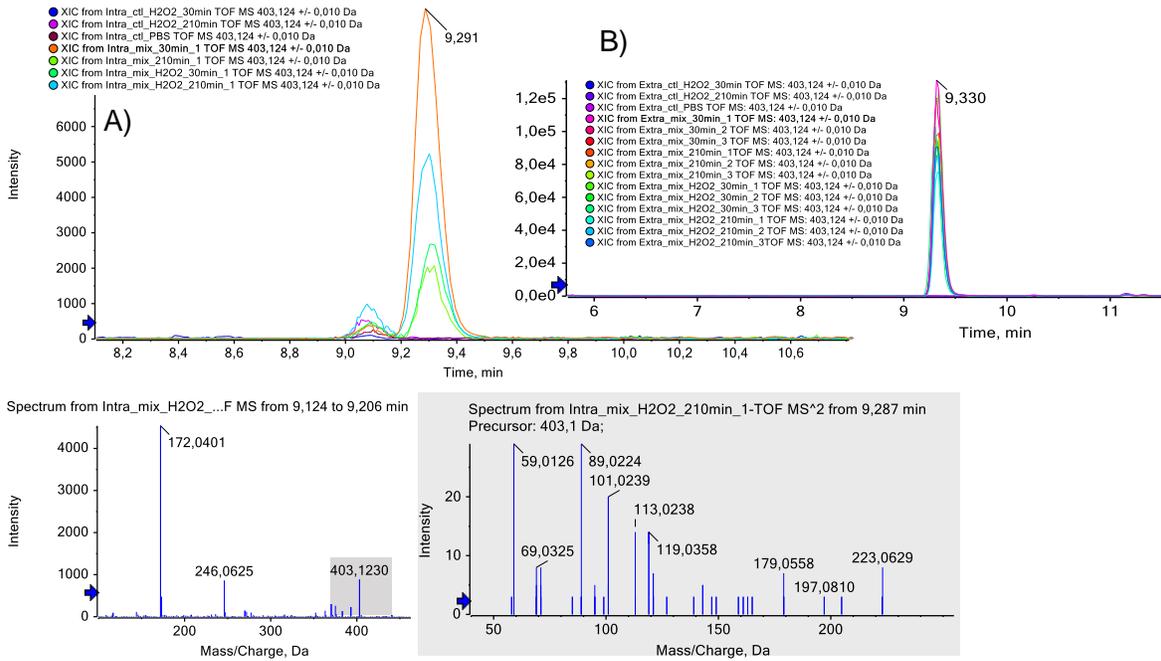
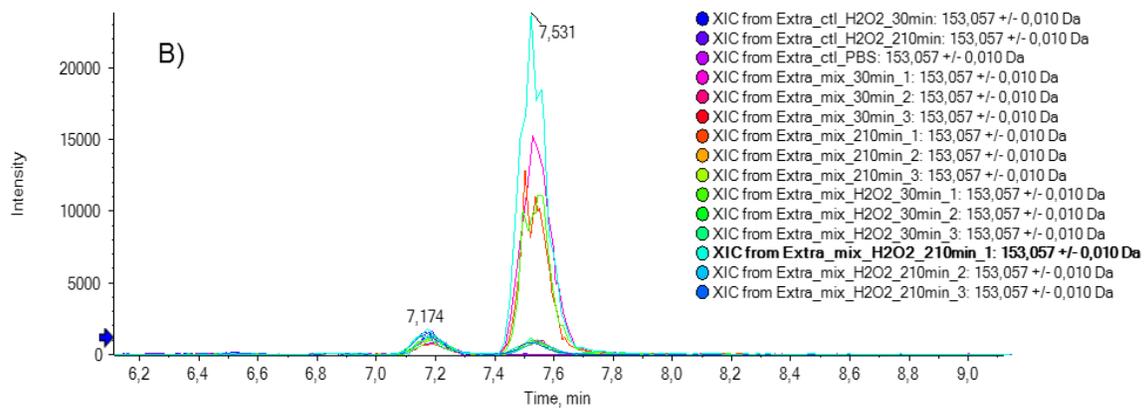
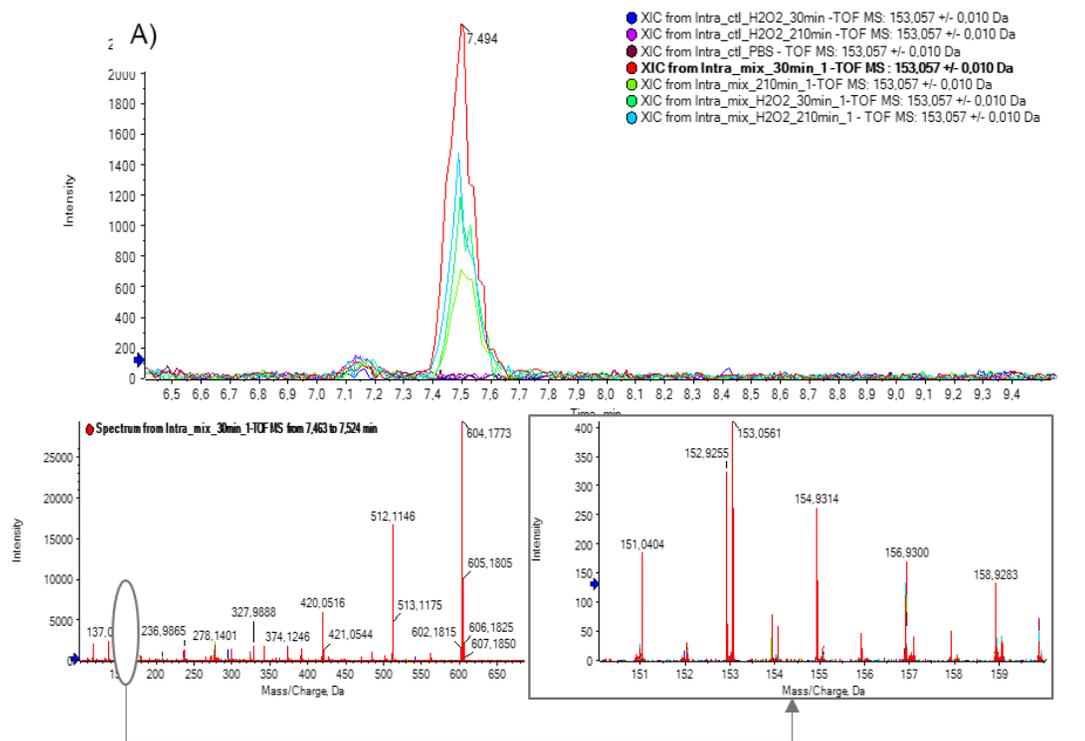


Figure 50 : XIC m/z 403.1230 et spectres de masse correspondants : A) XIC du 11-méthyl-oléoside dans les extraits intracellulaires; B) XIC du 11-méthyl-oléoside dans les milieux extracellulaires.

ANNEXE III-E



- XIC from Extra_ctl_H2O2_30min TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_ctl_H2O2_210min TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_ctl_PBS TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_mix_30min_1 TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_mix_210min_1 TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_mix_H2O2_30min_1 TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da
- XIC from Extra_mix_H2O2_210min_1 TOF MS: 217,017 +/- 0,010 Da

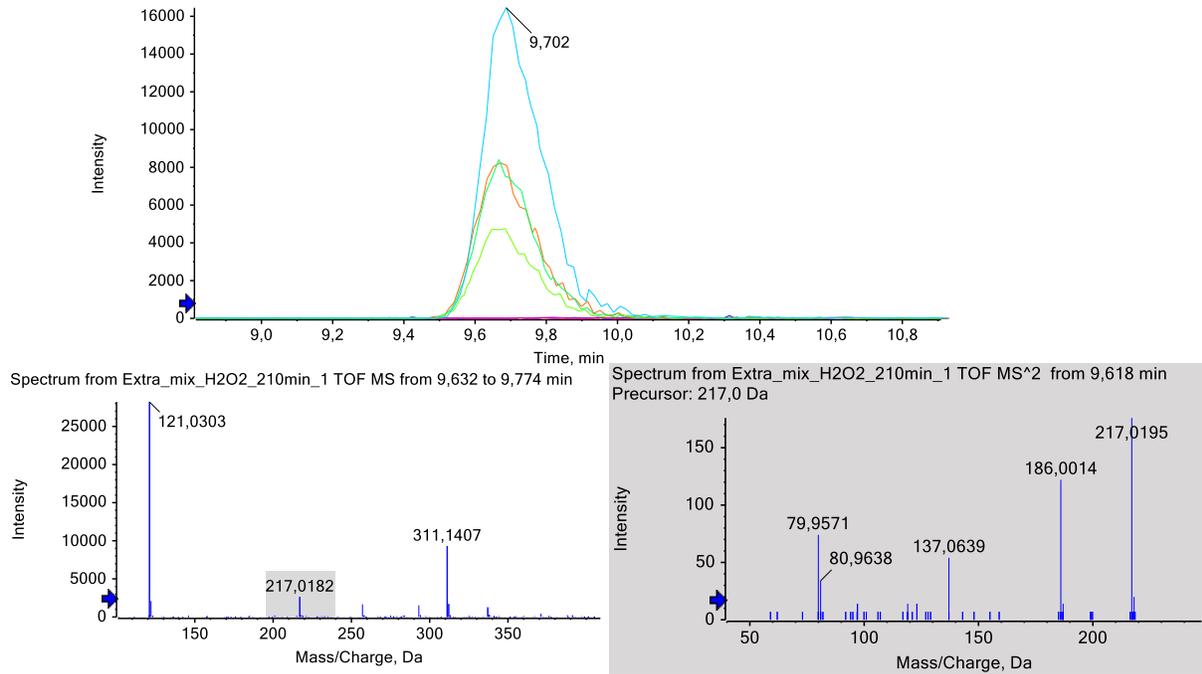


Figure 51 : XIC m/z 217,0182 dans les milieux extracellulaires des expérimentations n1 et spectres de masse et de fragmentation associés correspondant à l'identification du tyrosol sulfate.

RÉFÉRENCES

"<jp808683y.pdf>."

1924/2006, R. N. (2006). Règlement (CE) No 1924/2006 Du Parlement Européen Et Du Conseil du 20 décembre 2006 concernant les Allégations Nutritionnelles et de Santé portant sur les Denrées Alimentaires. Parlement Européen OJ: p. 9–25.

Abdel-Wahab, M. H., M. A. El-Mahdy, M. F. Abd-Allah, G. K. Helal, F. Khalifa and F. M. A. Hamada (2003). "Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart." Pharmacological Research **48**(5): 461-465.

Abuznait, A. H., H. Qosa, B. A. Busnena, K. A. El Sayed and A. Kaddoumi (2013). "Olive-Oil-Derived Oleocanthal Enhances beta-Amyloid Clearance as a Potential Neuroprotective Mechanism against Alzheimer's Disease: In Vitro and in Vivo Studies." Acs Chemical Neuroscience **4**(6): 973-982.

Adams, M. L., J. Grandpre, D. L. Katz and D. Shenson (2019). "The impact of key modifiable risk factors on leading chronic conditions." Preventive Medicine **120**: 113-118.

Ahmed, S. M., L. Luo, A. Namani, X. J. Wang and X. Tang (2017). "Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation." Biochim Biophys Acta **1863**(2): 585-597.

Akterin, S., R. F. Cowburn, A. Miranda-Vizuete, A. Jimenez, N. Bogdanovic, B. Winblad and A. Cedazo-Minguez (2006). "Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease." Cell Death Differ **13**(9): 1454-1465.

Al-Lahham, R., J. H. Deford and J. Papaconstantinou (2016). "Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway." Mol Cell Endocrinol **419**: 1-11.

Alam, Z. I., A. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, N. Cairns, C. D. Marsden, P. Jenner and B. Halliwell (1997). "Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra." J Neurochem **69**(3): 1196-1203.

Alcalay, R. N., Y. Gu, H. Mejia-Santana, L. Cote, K. S. Marder and N. Scarmeas (2012). "The association between Mediterranean diet adherence and Parkinson's disease." Mov Disord **27**(6): 771-774.

Alipieva, K., L. Korkina, I. E. Orhan and M. I. Georgiev (2014). "Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance." Biotechnology Advances **32**(6): 1065-1076.

Alirezaei, M., M. Rezaei, S. Hajighahramani, A. Sookhtezari and K. Kiani (2017). "Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats." J Physiol Sci **67**(1): 131-139.

Allouche, N., S. Sayadi and M. Damak (2004). "Phenolic Compounds With Antioxidant Activity From Olive Mill Wastewaters." Journal de la Société Chimique de Tunisie **6**: 33-43.

Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2001). "Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(12): 6923-6928.

Ammar, S., M. A. Oturan, L. Labiadh, A. Guersalli, R. Abdelhedi, N. Oturan and E. Brillas (2015). "Degradation of tyrosol by a novel electro-Fenton process using pyrite as heterogeneous source of iron catalyst." Water Res **74**: 77-87.

Anastasiou, C. A., M. Yannakoulia, M. H. Kosmidis, E. Dardiotis, G. M. Hadjigeorgiou, P. Sakka, X. Arampatzi, A. Bougea, I. Labropoulos and N. Scarmeas (2017). "Mediterranean diet and cognitive health: Initial results from the Hellenic Longitudinal Investigation of Ageing and Diet." PLoS one **12**(8): e0182048-e0182048.

Angeloni, C., M. Malaguti, M. C. Barbalace and S. Hrelia (2017). "Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection." Int J Mol Sci **18**(11).

Antenucci, S., L. Panzella, H. Farina, M. A. Ortenzi, E. Caneva, S. Martinotti, E. Ranzato, B. Burlando, M. d'Ischia, A. Napolitano and L. Verotta (2016). "Powering tyrosol antioxidant capacity and osteogenic activity by biocatalytic polymerization." RSC Advances **6**(4): 2993-3002.

Antolovich, M., D. R. Bedgood, Jr., A. G. Bishop, D. Jardine, P. D. Prenzler and K. Robards (2004). "LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants." J Agric Food Chem **52**(4): 962-971.

Apak, R., S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek and K. Güçlü (2013). "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)." Pure and Applied Chemistry **85**(5).

Apak, R., M. Ozyurek, K. Guclu and E. Capanoglu (2016). "Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays." J Agric Food Chem **64**(5): 1028-1045.

Aree, T. and S. Jongrungruangchok (2018). "Structure-antioxidant activity relationship of beta-cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay." Carbohydr Polym **199**: 661-669.

Arnold, S. E., Z. Arvanitakis, S. L. Macauley-Rambach, A. M. Koenig, H.-Y. Wang, R. S. Ahima, S. Craft, S. Gandy, C. Buettner, L. E. Stoeckel, D. M. Holtzman and D. M. Nathan (2018). "Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums." Nature reviews. Neurology **14**(3): 168-181.

Arteaga, J. F., M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado and J. M. Rodríguez-Mellado (2012). "Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles." Molecules (Basel, Switzerland) **17**(5): 5126-5138.

Atzeri A., R. Lucas, A. Incani, P. Peñalver, A. Zafra-Gómez, M. P. Melis, R. Pizzala, J. C. Morales and M. Deiana (2016). "Hydroxytyrosol and tyrosol sulfate metabolites protect against the oxidized cholesterol pro-oxidant effect in Caco-2 human enterocyte-like cells." Food Funct **7**(337).

- Augustyniak, E., A. Adam, K. Wojdyla, A. Rogowska-Wrzesinska, R. Willetts, A. Korkmaz, M. Atalay, D. Weber, T. Grune, C. Borsa, D. Gradinaru, R. Chand Bollineni, M. Fedorova and H. R. Griffiths (2015). "Validation of protein carbonyl measurement: a multi-centre study." Redox Biol **4**: 149-157.
- Austermann, K., N. Baecker, P. Stehle and M. Heer (2019). "Putative Effects of Nutritive Polyphenols on Bone Metabolism In Vivo-Evidence from Human Studies." Nutrients **11**(4): 871.
- Ba, F., P. K. T. Pang and C. G. Benishin (2003). "The establishment of a reliable cytotoxic system with SK-N-SH neuroblastoma cell culture." Journal of Neuroscience Methods **123**(1): 11-22.
- Baldacchino, G., D. Le Parc, B. Hickel, M. Gardes-Albert, Z. Abedinzadeh, D. Jore, S. Deycard, S. Bouffard, V. Mouton and E. Balanzat (1998). "Direct observation of HO₂/O₂- free radicals generated in water by a high-linear energy transfer pulsed heavy-ion beam." Radiat Res **149**(2): 128-133.
- Baldeiras, I., I. Santana, M. T. Proenca, M. H. Garrucho, R. Pascoal, A. Rodrigues, D. Duro and C. R. Oliveira (2008). "Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **15**(1): 117-128.
- Barbeito, A. G., H. J. Garringer, M. A. Baraibar, X. Gao, M. Arredondo, M. T. Nunez, M. A. Smith, B. Ghetti and R. Vidal (2009). "Abnormal iron metabolism and oxidative stress in mice expressing a mutant form of the ferritin light polypeptide gene." J Neurochem **109**(4): 1067-1078.
- Barone, E. and D. A. Butterfield (2015). "Insulin resistance in Alzheimer disease: Is heme oxygenase-1 an Achille's heel?" Neurobiology of Disease **84**: 69-77.
- Barone, E., F. Di Domenico, G. Cenini, R. Sultana, C. Cini, P. Preziosi, M. Perluigi, C. Mancuso and D. A. Butterfield (2011). "Biliverdin reductase--a protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment." Biochimica et biophysica acta **1812**(4): 480-487.
- Bastianetto, S., C. Ménard and R. Quirion (2015). "Neuroprotective action of resveratrol." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1852**(6): 1195-1201.
- Batinić-Haberle, I., J. S. Rebouças and I. Spasojević (2010). "Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential." Antioxidants & redox signaling **13**(6): 877-918.
- Bayram, B., B. Ozcelik, S. Grimm, T. Roeder, C. Schrader, I. M. Ernst, A. E. Wagner, T. Grune, J. Frank and G. Rimbach (2012). "A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression." Rejuvenation Res **15**(1): 71-81.
- Bazoti, F. N., J. Bergquist, K. E. Markides and A. Tsarbopoulos (2006). "Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1–40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry." Journal of The American Society for Mass Spectrometry **17**(4): 568-575.
- Bazoti, F. N., E. Gikas and A. Tsarbopoulos (2010). "Simultaneous quantification of oleuropein and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry." Biomed Chromatogr **24**(5): 506-515.

Beaudeau, J. L., J. Peynet, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, J. Delattre and A. Legrand (2006). "Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes." Annales Pharmaceutiques Françaises **64**(6): 373-381.

Becker, I. L. (2017). "Role of the Transcription Factor Nrf2 in Parkinson's Disease: New Insights." Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism **07**(04).

Bedioui, F. (1999). "Voltampérométrie. Théorie et mise en oeuvre expérimentale." Tech. Ing. Anal. Caractér. **3**(1): 2126.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2012). "Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid-beta cascade." Free Radic Biol Med **52**(3): 593-600.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2015). "Innovative Anthocyanin/Anthocyanidin Formulation Protects SK-N-SH Cells Against the Amyloid-beta Peptide-Induced Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **16**(1): 37-49.

Belkacemi, A. and C. Ramassamy (2016). "Anthocyanins Protect SK-N-SH Cells Against Acrolein-Induced Toxicity by Preserving the Cellular Redox State." J Alzheimers Dis **50**(4): 981-998.

Benavente-Garcia, O., J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno and D. R. J.A. (2000). "Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves." Food Chemistry **68**: 457-462.

Bendary, E., R. R. Francis, H. M. G. Ali, M. I. Sarwat and S. El Hady (2013). "Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds." Annals of Agricultural Sciences **58**(2): 173-181.

Benjamin, G. and A. Lucio Ferreira (2003). "Synergy in Plant Medicines." Current Medicinal Chemistry **10**(1): 13-20.

Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?" Neurobiology of Aging **16**(4): 661-674.

Berman, S. B. and T. G. Hastings (1999). "Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: Implications for Parkinson's disease." Journal of Neurochemistry **73**(3): 1127-1137.

Berr, C., F. Portet, I. Carriere, T. N. Akbaraly, C. Feart, V. Gourlet, N. Combe, P. Barberger-Gateau and K. Ritchie (2009). "Olive oil and cognition: results from the three-city study." Dement Geriatr Cogn Disord **28**(4): 357-364.

Bertelli, A. A., M. Migliori, V. Panichi, B. Longoni, N. Origlia, A. Ferretti, M. G. Cuttano and L. Giovannini (2002). "Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine." Ann N Y Acad Sci **957**: 295-301.

Bharath, S. and J. K. Andersen (2005). "Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: Implications for Parkinson's disease." Antioxidants and Redox Signaling **7**(7-8): 900-910.

Bidlack, J., M. Malone and R. Benson (1992). "Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in

Plants." Proc. Okla. Acad. Sci.(72): 51-56.

Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman (1978). "Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones." Cancer Research **38**(11 Part 1): 3751.

Bielski, B. H. J. and H. W. Richter (1977). "Study of the superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption." Journal of the American Chemical Society **99**(9): 3019-3023.

Birks, J. S. (2006). "Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." Cochrane Database of Systematic Reviews(1).

Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal (2003). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." J Biol Chem **278**(45): 44675-44682.

Bobela, W., P. Aebischer and B. L. Schneider (2015). "Alpha-Synuclein as a Mediator in the Interplay between Aging and Parkinson's Disease." Biomolecules **5**(4): 2675-2700.

Boccardi, V., A. Esposito, M. R. Rizzo, R. Marfella, M. Barbieri and G. Paolisso (2013). "Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly." PloS one **8**(4): e62781-e62781.

Bohnert, N., J. Chagnon and P. Dion (2015). Projections démographiques pour le Canada (2013 à 2063), les provinces et les territoires (2013 à 2038), Statistique Canada.

Bors, W. and C. Michel (2006). "Chemistry of the Antioxidant Effect of Polyphenols." Annals of the New York Academy of Sciences **957**(1): 57-69.

Boskou, D., G. Blekas and M. Tsimidou (2005). "Phenolic compounds in olive oil and olives." Current Topics in Nutraceutical Research **3**(2): 125-136.

Boyd-Kimball, D., H. F. Poon, B. C. Lynn, J. Cai, W. M. Pierce Jr, J. B. Klein, J. Ferguson, C. D. Link and D. A. Butterfield (2006). "Proteomic identification of proteins specifically oxidized in *Caenorhabditis elegans* expressing human A β (1-42): Implications for Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **27**(9): 1239-1249.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathologica **82**(4): 239-259.

Braak, H. and K. Del Tredici (2011). "The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty." Acta Neuropathol **121**(2): 171-181.

Braak, H., K. Del Tredici, H. Bratzke, J. Hamm-Clement, D. Sandmann-Keil and U. Rub (2002). "Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages)." Journal of neurology **249** Suppl 3: III/1-5.

Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur and E. Braak (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **24**(2): 197-211.

Braak, H., U. Rüb, E. N. H. Jansen Steur, K. Del Tredici and R. A. I. de Vos (2005). "Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease." Neurology **64**(8): 1404.

Brosseron, F., A. Träschütz, C. N. Widmann, M. P. Kummer, P. Tacik, F. Santarelli, F. Jessen and M. T. Heneka (2018). "Characterization and clinical use of inflammatory cerebrospinal fluid protein markers in Alzheimer's disease." Alzheimer's research & therapy **10**(1): 25-25.

Bubber, P., V. Haroutunian, G. Fisch, J. P. Blass and G. E. Gibson (2005). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications." Ann Neurol **57**(5): 695-703.

Burton, E. J., I. G. McKeith, D. J. Burn, E. D. Williams and J. T. O'Brien (2004). "Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls." Brain **127**(Pt 4): 791-800.

Butterfield, D. A. and C. M. Lauderback (2002). "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress¹, 21Guest Editors: Mark A. Smith and George Perry²This article is part of a series of reviews on "Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." The full list of papers may be found on the homepage of the journal." Free Radical Biology and Medicine **32**(11): 1050-1060.

Butterfield, D. A., H. F. Poon, D. St. Clair, J. N. Keller, W. M. Pierce, J. B. Klein and W. R. Markesbery (2006). "Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: Insights into the development of Alzheimer's disease." Neurobiology of Disease **22**(2): 223-232.

Butterfield, D. A., A. M. Swomley and R. Sultana (2012). "Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression." Antioxidants & Redox Signaling **19**(8): 823-835.

Canada, A. d. l. s. p. d. (2016). Prévalence et coûts financiers des maladies cognitives au Canada : un rapport de la Société Alzheimer du Canada (2016) - PSPMC: Volume 36-10, octobre 2016 - Canada.ca.

Canada, P. (2019). "Traitements." from <https://www.parkinson.ca/fr/la-maladie/traitements/>.

Canuelo, A., B. Gilbert-Lopez, P. Pacheco-Linan, E. Martinez-Lara, E. Siles and A. Miranda-Vizueté (2012). "Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*." Mech Ageing Dev **133**(8): 563-574.

Cao, J., J. Hou, J. Ping and D. Cai (2018). "Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease." Molecular neurodegeneration **13**(1): 64-64.

Capo, C. R., J. Z. Pedersen, M. Falconi and L. Rossi (2017). "Oleuropein shows copper complexing properties and noxious effect on cultured SH-SY5Y neuroblastoma cells depending on cell copper content." J Trace Elem Med Bio **44**: 225-232.

Cardoso, S. M., S. Guyot, N. Marnet, J. A. Lopes-da-Silva, A. M. S. Silva, C. M. G. C. Renard and M. A. Coimbra (2006). "Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**(10): 1495-1502.

Cardoso Susana, M., S. Guyot, N. Marnet, A. Lopes-da-Silva José, M. G. C. Renard Catherine and A. Coimbra Manuel (2004). "Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry." Journal of the Science of Food and Agriculture **85**(1): 21-32.

Carluccio, M. A., N. Calabriso, E. Scoditti, M. Massaro and R. De Caterina (2015). Chapter 27 - Mediterranean Diet Polyphenols. The Mediterranean Diet. V. R. Preedy and R. R. Watson. San Diego, Academic Press: 291-300.

Carrasco-Pancorbo, A., L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, M. Del Carlo, T. Gallina-Toschi, G. Lercker, D. Compagnone and A. Fernandez-Gutierrez (2005). "Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil." J Agric Food Chem **53**(23): 8918-8925.

Caruana, M., J. Neuner, T. Högen, F. Schmidt, F. Kamp, C. Scerri, A. Giese and N. Vassallo (2012). "Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates in vitro." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1818**(11): 2502-2510.

Casamenti, F. and M. Stefani (2016). "Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration." Expert Rev Neurother: 1-14.

Castellani, R. J., G. Plascencia-Villa and G. Perry (2019). "The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation." Laboratory Investigation.

Castro-Barquero, S., R. M. Lamuela-Raventós, M. Doménech and R. Estruch (2018). "Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity." Nutrients **10**(10): 1523.

Caterina Manna, P. G., Giovanna Maisto, Valeria Cucciolla, Stefania D'Angelo, Vincenzo Zappia (2000). "Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in caco-2 cells." FEBS Letters **470** 341-344.

Caturla, N., L. Pérez-Fons, A. Estepa and V. Micol (2005). "Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes." Chemistry and Physics of Lipids **137**(1): 2-17.

Chakroun, H., M. Bouaziz, A. Dhouib and S. Sayadi (2012). "Enzymatic oxidative transformation of phenols by *Trametes trogii* laccases." Environ Technol **33**(16-18): 1977-1985.

Chakroun, H., M. Bouaziz, T. Yangui, I. Blibech, A. Dhouib and S. Sayadi (2013). "Enzymatic transformation of tyrosol by *Trametes trogii* laccases: Identification of the product and study of its biological activities." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **87**: 11-17.

Chandramohan, R., L. Pari, A. Rathinam and B. A. Sheikh (2015). "Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats." Chemico-Biological Interactions **229**: 44-54.

Chao, X. J., Z. W. Chen, A. M. Liu, X. X. He, S. G. Wang, Y. T. Wang, P. Q. Liu, C. Ramassamy, S. H. Mak, W. Cui, A. N. Kong, Z. L. Yu, Y. F. Han and R. B. Pi (2014). "Effect of Tacrine-3-caffeic Acid, A Novel Multifunctional Anti-Alzheimer's Dimer, Against Oxidative-Stress-Induced Cell

Death in HT22 Hippocampal Neurons: Involvement of Nrf2/HO-1 Pathway." Cns Neuroscience & Therapeutics **20**(9): 840-850.

Chen, S. T., D. Volle, J. Jalil, P. Wu and G. W. Small (2019). "Health-Promoting Strategies for the Aging Brain." The American Journal of Geriatric Psychiatry **27**(3): 213-236.

Cheng, Z., J. Ren, Y. Li, W. Chang and Z. Chen (2002). "Phenolic antioxidants: electrochemical behavior and the mechanistic elements underlying their anodic oxidation reaction." Redox Rep **7**(6): 395-402.

Cheng, Z., Y. Tseng and M. F. White (2010). "Insulin signaling meets mitochondria in metabolism." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **21**(10): 589-598.

Chichirau, A., M. Flueraru, L. L. Chepelev, J. S. Wright, W. G. Willmore, T. Durst, H. H. Hussain and M. Charron (2005). "Mechanism of cytotoxicity of catechols and a naphthalenediol in PC12-AC cells: the connection between extracellular autoxidation and molecular electronic structure." Free Radical Biology and Medicine **38**(3): 344-355.

Chimi, H., J. Cillard, P. Cillard and M. Rahmani (1991). "Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants." Journal of the American Oil Chemists Society **68**(5): 307-312.

Ci, X., F. Frisch, F. Lavoie, P. Germain, R. Lecomte, J. E. van Lier, F. Benard and A. C. Carpentier (2006). "The effect of insulin on the intracellular distribution of 14(R,S)-[18F]Fluoro-6-thiaheptadecanoic acid in rats." Mol Imaging Biol **8**(4): 237-244.

Cicco, N., M. T. Lanorte, M. Paraggio, M. Viggiano and V. Lattanzio (2009). "A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts." Microchemical Journal **91**(1): 107-110.

Cicerale, S., X. A. Conlan, A. J. Sinclair and R. S. J. Keast (2008). "Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **49**(3): 218-236.

Consonni, R. and L. R. Cagliani (2019). "NMR Studies on Italian PDO Olive Oils and their Potential in Olive-Tree-Derived Products Characterization." European Journal of Lipid Science and Technology **121**(3): 1800174.

Cornwell, D. G. and J. Ma (2007). "Studies in vitamin E: biochemistry and molecular biology of tocopherol quinones." Vitam Horm **76**: 99-134.

Cornwell, D. G. and J. Ma (2008). "Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts." J Agric Food Chem **56**(19): 8774-8786.

Corona, G., J. P. Spencer and M. A. Dessi (2009). "Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract." Toxicol Ind Health **25**(4-5): 285-293.

Corona, G., X. Tzounis, M. Assunta Dessi, M. Deiana, E. S. Debnam, F. Visioli and J. P. Spencer (2006). "The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation." Free Radic Res **40**(6): 647-658.

Cos, P., L. Ying, M. Calomme, J. P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A. J. Vlietinck and D. V. Berghe (1998). "Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers." Journal of Natural Products **61**(1): 71-76.

Craft, S., E. Peskind, M. W. Schwartz, G. D. Schellenberg, M. Raskind and D. Porte, Jr. (1998). "Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype." Neurology **50**(1): 164-168.

Cummings, J., G. Lee, A. Ritter and K. Zhong (2018). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018." Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions **4**: 195-214.

Cuvelier, M.-E., H. Richard and C. Berset (1992). "Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **56**(2): 324-325.

D'Angelo, S., C. Manna, V. Migliardi, O. Mazzoni, P. Morrica, G. Capasso, G. Pontoni, P. Galletti and V. Zappia (2001). "Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil." Drug Metab Dispos **29**(11): 1492-1498.

Daccache, A., C. Lion, N. Sibille, M. Gerard, C. Slomianny, G. Lippens and P. Cotelle (2011). "Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors." Neurochemistry International **58**(6): 700-707.

Dagher, Y. Z., U. Miguel, I.-M. Yasser, D. Mahsa, Z. Yu, L. Kevin Michel-Herve, F. Vladimir, C. E. Alan, D. L. Collins and Alain (2015). "Network structure of brain atrophy in de novo Parkinson's disease."

Dale, E. E. (2014). "Hydrogen Peroxide Produced by Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalysis: Biological Implications." Current Pharmaceutical Design **20**(2): 155-160.

Dang, T. N., M. Arseneault, V. Murthy and C. Ramassamy (2010). "Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease." Curr Mol Pharmacol **3**(2): 66-78.

Dang, T. N., M. Arseneault, N. Zarkovic, G. Waeg and C. Ramassamy (2010). "Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **21**(4): 1197-1216.

Dangles, O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. Paris, Lavoisier Edition.

Dangles, O. (2012). "Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance." Current Organic Chemistry **16**: 692-714.

Dangles, O., C. Dufour, C. Tonnelé and P. Trouillas (2017). The Physical Chemistry of Polyphenols: Insights into the Activity of Polyphenols in Humans at the Molecular Level. Recent Advances in Polyphenol Research. J. W. Sons, Kumi Yoshida, Véronique Cheynier and Stéphane Quideau.

Dashwood, W.-M., G. A. Orner and R. H. Dashwood (2002). "Inhibition of β -catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H₂O₂ at

physiologically relevant EGCG concentrations." Biochemical and Biophysical Research Communications **296**(3): 584-588.

Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

David, D. C., S. Hauptmann, I. Scherping, K. Schuessel, U. Keil, P. Rizzu, R. Ravid, S. Drose, U. Brandt, W. E. Muller, A. Eckert and J. Gotz (2005). "Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice." J Biol Chem **280**(25): 23802-23814.

de Bock, M., E. B. Thorstensen, J. G. Derraik, H. V. Henderson, P. L. Hofman and W. S. Cutfield (2013). "Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract." Mol Nutr Food Res **57**(11): 2079-2085.

De Felice, F. G. (2013). "Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications." The Journal of clinical investigation **123**(2): 531-539.

De Felice, F. G., M. N. N. Vieira, T. R. Bomfim, H. Decker, P. T. Velasco, M. P. Lambert, K. L. Viola, W.-Q. Zhao, S. T. Ferreira and W. L. Klein (2009). "Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(6): 1971-1976.

De La Cruz, J. P., M. I. Ruiz-Moreno, A. Guerrero, J. A. López-Villodres, J. J. Reyes, J. L. Espartero, M. T. Labajos and J. A. González-Correa (2015). "Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain." The Journal of Nutritional Biochemistry **26**(5): 549-555.

De la Luz-Hdez, K. (2012). Metabolomics and Mammalian Cell Culture. Metabolomics. D. U. Roessner, InTech.

de la Torre-Carbot, K., J. L. Chavez-Servin, O. Jauregui, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventos, M. Fito, M. I. Covas, D. Munoz-Aguayo and M. C. Lopez-Sabater (2007). "Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." Anal Chim Acta **583**(2): 402-410.

de la Torre, R. (2008). "Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans." Inflammopharmacology **16**(5): 245-247.

De la Torre, R., D. Corella, O. Castaner, M. A. Martinez-Gonzalez, J. Salas-Salvador, J. Vila, R. Estruch, J. V. Sorli, F. Aros, M. Fiol, E. Ros, L. Serra-Majem, X. Pinto, E. Gomez-Gracia, J. Lapetra, M. Ruiz-Canela, J. Basora, E. M. Asensio, M. I. Covas and M. Fito (2017). "Protective effect of homovanillyl alcohol on cardiovascular disease and total mortality: virgin olive oil, wine, and catechol-methylthion." Am J Clin Nutr **105**(6): 1297-1304.

de Lorgeril, M., P. Salen, J.-L. Martin, I. Monjaud, P. Boucher and N. Mamelle (1998). "Mediterranean Dietary Pattern in a Randomized Trial: Prolonged Survival and Possible Reduced Cancer Rate." Archives of Internal Medicine **158**(11): 1181-1187.

De Lucia, M., L. Panzella, A. Pezzella, A. Napolitano and M. d'Ischia (2006). "Oxidative chemistry of the natural antioxidant hydroxytyrosol: hydrogen peroxide-dependent hydroxylation and hydroxyquinone/o-quinone coupling pathways." Tetrahedron **62**(6): 1273-1278.

de Vos-Houben, J. M. J., N. R. Ottenheim, A. Kafatos, B. Buijsse, G. J. Hageman, D. Kromhout and E. J. Giltay (2012). "Telomere length, oxidative stress, and antioxidant status in elderly men in Zutphen and Crete." Mechanisms of Ageing and Development **133**(6): 373-377.

Deane, R., A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman and B. V. Zlokovic (2008). "apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain." J Clin Invest **118**(12): 4002-4013.

DeCoursey, T. E. and E. Ligeti (2005). "Regulation and termination of NADPH oxidase activity." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **62**(19): 2173-2193.

Deiana, M., G. Corona, A. Incani, D. Loru, A. Rosa, A. Atzeri, M. Paola Melis and M. Assunta Dessi (2010). "Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells." Food Chem Toxicol **48**(10): 3008-3016.

Deiana, M., A. Incani, A. Rosa, A. Atzeri, D. Loru, B. Cabboi, M. Paola Melis, R. Lucas, J. C. Morales and M. Assunta Dessi (2011). "Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cells against H₂O₂ induced oxidative damage." Chemico-Biological Interactions **193**(3): 232-239.

Dell'Agli, M., R. Fagnani, N. Mitro, S. Scurati, M. Masciadri, L. Mussoni, G. V. Galli, E. Bosisio, M. Crestani, E. De Fabiani, E. Tremoli and D. Caruso (2006). "Minor Components of Olive Oil Modulate Proatherogenic Adhesion Molecules Involved in Endothelial Activation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(9): 3259-3264.

Deng, M., X. D. Ju, D. S. Fan, P. F. Tu, J. Zhang and Y. Shen (2008). "Verbascoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from MPP⁺-induced apoptosis." Chinese Pharmacological Bulletin **24**(10): 1297-1301.

Dewapriya, P., S. W. Himaya, Y. X. Li and S. K. Kim (2013). "Tyrosol exerts a protective effect against dopaminergic neuronal cell death in in vitro model of Parkinson's disease." Food Chem **141**(2): 1147-1157.

Dey, A., R. Bhattacharya, A. Mukherjee and D. K. Pandey (2016). "Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions." Biotechnol Adv.

Di Benedetto, R., R. Vari, B. Scazzocchio, C. Filesi, C. Santangelo, C. Giovannini, P. Matarrese, M. D'Archivio and R. Masella (2007). "Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness." Nutr Metab Cardiovasc Dis **17**(7): 535-545.

Di Maio, I., S. Esposito, A. Taticchi, R. Selvaggini, G. Veneziani, S. Urbani and M. Servili (2011). "HPLC-ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil." Food Chemistry **125**(1): 21-28.

Di Meo, F., G. Fabre, K. Berka, T. Ossman, B. Chantemargue, M. Paloncýová, P. Marquet, M. Otyepka and P. Trouillas (2016). "In silico pharmacology: Drug membrane partitioning and crossing." Pharmacological Research **111**: 471-486.

Di Meo, F., V. Lemaur, J. Cornil, R. Lazzaroni, J. L. Duroux, Y. Olivier and P. Trouillas (2013). "Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer." J Phys Chem A **117**(10): 2082-2092.

Dias, V., E. Junn and M. M. Mouradian (2013). "The role of oxidative stress in Parkinson's disease." J Parkinsons Dis **3**(4): 461-491.

Dickinson, B. C., J. Peltier, D. Stone, D. V. Schaffer and C. J. Chang (2010). "Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain." Nature Chemical Biology **7**: 106.

Dierkes, G., S. Krieger, R. Duck, A. Bongartz, O. J. Schmitz and H. Hayen (2012). "High-performance liquid chromatography-mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency." J Agric Food Chem **60**(31): 7597-7606.

Dinda, B., M. Dinda, G. Kulsji, A. Chakraborty and S. Dinda (2019). "Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review." European Journal of Medicinal Chemistry **169**: 185-199.

Dinis-Oliveira, R. J., F. Remiao, H. Carmo, J. A. Duarte, A. S. Navarro, M. L. Bastos and F. Carvalho (2006). "Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease." Neurotoxicology **27**(6): 1110-1122.

Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto and P. Talalay (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(18): 11908.

Dinkova-Kostova, A. T., R. V. Kostov and P. Canning (2017). "Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants." Archives of biochemistry and biophysics **617**: 84-93.

Diomedea, L., S. Rigacci, M. Romeo, M. Stefani and M. Salmona (2013). "Oleuropein Aglycone Protects Transgenic C. elegans Strains Expressing A β 42 by Reducing Plaque Load and Motor Deficit." PLOS ONE **8**(3): e58893.

Doggui, S., A. Belkacemi, G. D. Paka, M. Perrotte, R. Pi and C. Ramassamy (2013). "Curcumin protects neuronal-like cells against acrolein by restoring Akt and redox signaling pathways." Mol Nutr Food Res **57**(9): 1660-1670.

Drachman, D. A. and J. Leavitt (1974). "Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?" Arch Neurol **30**(2): 113-121.

Dumont, M., C. Stack, C. Elipenahli, S. Jainuddin, M. Gerges, N. N. Starkova, L. Yang, A. A. Starkov and F. Beal (2011). "Behavioral deficit, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction precede tau pathology in P301S transgenic mice." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **25**(11): 4063-4072.

Duyckaerts, C., M. Bennefib, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette and J. J. Hauw (1997). "Modeling the Relation Between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status." Neurobiology of Aging **18**(3): 267-273.

Echeverria, V., S. Burgess, J. Gamble-George, R. Zeitlin, X. Lin, C. Cao and G. W. Arendash (2009). "Sorafenib inhibits nuclear factor kappa B, decreases inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression, and restores working memory in APPswe mice." Neuroscience **162**(4): 1220-1231.

Efsa Panel on Dietetic Products, N. and Allergies (2012). "Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006." EFSA Journal **10**(8): 2848.

Elizabeth, N. B., J. L. Biedler, B. A. Spengler and K. M. Lyser (1981). "The Fine Structure of Continuous Human Neuroblastoma Lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC." In Vitro **17**(7): 619-631.

Enache, T. A., A. Amine, C. M. Brett and A. M. Oliveira-Brett (2013). "Virgin olive oil ortho-phenols-electroanalytical quantification." Talanta **105**: 179-186.

Enache, T. A. and A. M. Oliveira-Brett (2011). "Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways." Journal of Electroanalytical Chemistry **655**(1): 9-16.

Erdemgil, F. Z., S. Sanli, N. Sanli, G. Ozkan, J. Barbosa, J. Guiteras and J. L. Beltran (2007). "Determination of pK(a) values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry." Talanta **72**(2): 489-496.

Espinosa, R. R., R. Inchingolo, S. M. Alencar, M. T. Rodriguez-Estrada and I. A. Castro (2015). "Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters." Food Chemistry **182**: 95-104.

Esposito, K., C. M. Kastorini, D. B. Panagiotakos and D. Giugliano (2011). "Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials." Metab Syndr Relat Disord **9**(1): 1-12.

Estruch, R., M. A. Martinez-Gonzalez, D. Corella, J. Salas-Salvado, V. Ruiz-Gutierrez, M. I. Covas, M. Fiol, E. Gomez-Gracia, M. C. Lopez-Sabater, E. Vinyoles, F. Aros, M. Conde, C. Lahoz, J. Lapetra, G. Saez and E. Ros (2006). "Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial." Ann Intern Med **145**(1): 1-11.

Estruch, R., E. Ros, J. Salas-Salvadó, M.-I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. Gómez-Gracia, V. Ruiz-Gutiérrez, M. Fiol, J. Lapetra, R. M. Lamuela-Raventos, L. Serra-Majem, X. Pintó, J. Basora, M. A. Muñoz, J. V. Sorlí, J. A. Martínez and M. A. Martínez-González (2013). "Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet." New England Journal of Medicine **368**(14): 1279-1290.

Eurostat. (2019). "Statistiques sur les projections démographiques régionales - Statistics Explained." from https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Statistics_on_regional_population_projections/fr.

Fabre, G., I. Bayach, K. Berka, M. Paloncýová, M. Starok, C. Rossi, J.-L. Duroux, M. Otyepka and P. Trouillas (2015). "Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes." Chemical Communications **51**(36): 7713-7716.

Fahn, S. and G. Cohen (1992). "The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it." Ann Neurol **32**(6): 804-812.

Faraci, F. M. (2011). "Protecting against vascular disease in brain." <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01310.2010>.

Fási, L., F. Di Meo, C.-Y. Kuo, S. Stojkovic Buric, A. Martins, N. Kúsz, Z. Béni, M. Dékány, G. T. Balogh, M. Pesic, H.-C. Wang, P. Trouillas and A. Hunyadi (2019). "Antioxidant-Inspired Drug Discovery: Antitumor Metabolite Is Formed in Situ from a Hydroxycinnamic Acid Derivative upon Free-Radical Scavenging." Journal of Medicinal Chemistry **62**(3): 1657-1668.

Feng, Y., Y. Xia, G. Yu, X. Shu, H. Ge, K. Zeng, J. Wang and X. Wang (2013). "Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity induced by H₂O₂." Journal of Neurochemistry **126**(2): 234-242.

Fernandez-Pastor, I., A. Fernandez-Hernandez, F. Rivas, A. Martinez, A. Garcia-Granados and A. Parra (2016). "Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Alkyl-Carbonate Derivatives." J Nat Prod **79**(7): 1737-1745.

Fernández del Río, L., E. Gutiérrez-Casado, A. Varela-López and M. J. Villalba (2016). "Olive Oil and the Hallmarks of Aging." Molecules **21**(2).

Ferreira, M., H. Varela, R. M. Torresi and G. Tremiliosi-Filho (2006). "Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds." Electrochimica Acta **52**(2): 434-442.

Ferro-Luzzi, A. and F. Branca (1995). "Mediterranean diet, Italian-style: prototype of a healthy diet." The American Journal of Clinical Nutrition **61**(6): 1338S-1345S.

Fessel, J. P., C. Hulette, S. Powell, L. J. Roberts li and J. Zhang (2003). "Isofurans, but not F₂-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease." Journal of Neurochemistry **85**(3): 645-650.

Figueira, I., G. Garcia, R. C. Pimpão, A. P. Terrasso, I. Costa, A. F. Almeida, L. Tavares, T. F. Pais, P. Pinto, M. R. Ventura, A. Filipe, G. J. McDougall, D. Stewart, K. S. Kim, I. Palmela, D. Brites, M. A. Brito, C. Brito and C. N. Santos (2017). "Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection." Scientific reports **7**(1): 11456-11456.

Figueira, I., R. Menezes, D. Macedo, I. Costa and C. Nunes dos Santos (2017). "Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain." Current Neuropharmacology **15**(4): 562-594.

Fine, J. M., A. M. Baillargeon, D. B. Renner, N. S. Hoerster, J. Tokarev, S. Colton, A. Pelleg, A. Andrews, K. A. Sparley, K. M. Krogh, W. H. Frey and L. R. Hanson (2012). "Intranasal deferoxamine improves performance in radial arm water maze, stabilizes HIF-1 α , and phosphorylates GSK3 β in P301L tau transgenic mice." Exp Brain Res **219**(3): 381-390.

Fjell Anders, M. and B. Walhovd Kristine (2010). Structural Brain Changes in Aging: Courses, Causes and Cognitive Consequences. Reviews in the Neurosciences. **21**: 187.

Flemmig, J., K. Kuchta, J. Arnhold and H. W. Rauwald (2011). "Olea europaea leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase." Phytomedicine **18**(7): 561-566.

Forkink, M., J. A. M. Smeitink, R. Brock, P. H. G. M. Willems and W. J. H. Koopman (2010). "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(6): 1034-1044.

Forman, H. J., K. J. A. Davies and F. Ursini (2014). "How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo." Free Radical Biology and Medicine **66**: 24-35.

Fraga, C. G. (2007). "Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions." IUBMB Life **59**(4-5): 308-315.

Francis, H. and R. Stevenson (2013). "The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain." Appetite **63**: 119-128.

Fulcrand, H. U. d. S. F. I. d. C., Laboratoire de Chimie des Polyphenols), A. Cheminat and R. Brouillard (1992). "Reactivity of the O-quinone derived from caffeic acid." **v. 16**.

Galasko, D. R., E. Peskind, C. M. Clark, J. F. Quinn, J. M. Ringman, G. A. Jicha, C. Cotman, B. Cottrell, T. J. Montine, R. G. Thomas, P. Aisen and S. Alzheimer's Disease Cooperative (2012). "Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures." Archives of neurology **69**(7): 836-841.

Gan, L. and J. A. Johnson (2014). "Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases." Biochim Biophys Acta **1842**(8): 1208-1218.

Ganesh, Y. V., G. Negi, S. S. Sharma and A. Kumar (2013). "Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF-kappaB pathways in diabetic neuropathy." Redox Biol **1**: 394-397.

Gao, X., H. Chen, T. T. Fung, G. Logroscino, M. A. Schwarzschild, F. B. Hu and A. Ascherio (2007). "Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease." The American journal of clinical nutrition **86**(5): 1486-1494.

Garbarino, V. R., M. E. Orr, K. A. Rodriguez and R. Buffenstein (2015). "Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: Lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates." Arch Biochem Biophys **576**: 8-16.

García-González, D. L., R. Aparicio-Ruiz and R. Aparicio (2008). "Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(7): 602-607.

Garcia-Padial, M., M. C. Martinez-Oharriz, I. Navarro-Blasco and A. Zornoza (2013). "The role of cyclodextrins in ORAC-fluorescence assays. antioxidant capacity of tyrosol and caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin." J Agric Food Chem **61**(50): 12260-12264.

García-Villalba, R., M. Larrosa, S. Possemiers, F. A. Tomás-Barberán and J. C. Espín (2014). "Bioavailability of phenolics from an oleuropein-rich olive (*Olea europaea*) leaf extract and its acute effect on plasma antioxidant status: comparison between pre- and postmenopausal women." European Journal of Nutrition **53**(4): 1015-1027.

Gardener, S. L., S. R. Rainey-Smith, M. B. Barnes, H. R. Sohrabi, M. Weinborn, Y. Y. Lim, K. Harrington, K. Taddei, Y. Gu, A. Rembach, C. Szoeker, K. A. Ellis, C. L. Masters, S. L. Macaulay,

C. C. Rowe, D. Ames, J. B. Keogh, N. Scarmeas and R. N. Martins (2014). "Dietary patterns and cognitive decline in an Australian study of ageing." Molecular Psychiatry **20**: 860.

Gardès-Albert, M. (2006). "Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène." Annales Pharmaceutiques Françaises **64**(6): 365-372.

Gasperotti, M., D. Masuero, G. Guella, F. Mattivi and U. Vrhovsek (2014). "Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC–ESI-MS/MS." Talanta **128**: 221-230.

Gasperotti, M., S. Passamonti, F. Tramer, D. Masuero, G. Guella, F. Mattivi and U. Vrhovsek (2015). "Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination?" ACS Chem Neurosci **6**(8): 1341-1352.

Gauthier, S., B. Reisberg, M. Zaudig, R. C. Petersen, K. Ritchie, K. Broich, S. Belleville, H. Brodaty, D. Bennett, H. Chertkow, J. L. Cummings, M. de Leon, H. Feldman, M. Ganguli, H. Hampel, P. Scheltens, M. C. Tierney, P. Whitehouse and B. Winblad (2006). "Mild cognitive impairment." The Lancet **367**(9518): 1262-1270.

Gaweda-Walerych, K. and C. Zekanowski (2013). "Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - Relevance to Parkinson's disease pathogenesis." Acta Neurobiologiae Experimentalis **73**(2): 199-224.

Gentile, L., N. A. Uccella and G. Sivakumar (2017). "Soft-MS and Computational Mapping of Oleuropein." Int J Mol Sci **18**(5).

Giasson, B. I., J. P. Covy, N. M. Bonini, H. I. Hurtig, M. J. Farrer, J. Q. Trojanowski and V. M. Van Deerlin (2006). "Biochemical and pathological characterization of Lrrk2." Ann Neurol **59**(2): 315-322.

Giordano, E., O. Dangles, N. Rakotomanomana, S. Baracchini and F. Visioli (2015). "3-O-Hydroxytyrosol glucuronide and 4-O-hydroxytyrosol glucuronide reduce endoplasmic reticulum stress in vitro." Food Funct **6**(10): 3275-3281.

Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio and P. G. Pelicci (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 722-728.

Giraldo, E., A. Lloret, T. Fuchsberger and J. Vina (2014). "Aβ and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E." Redox Biol **2**: 873-877.

Giunta, B., F. Fernandez, W. V. Nikolic, D. Obregon, E. Rrapo, T. Town and J. Tan (2008). "Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease." J Neuroinflammation **5**: 51.

Go, Y.-M. and D. P. Jones (2013). "The Redox Proteome." Journal of Biological Chemistry **288**(37): 26512-26520.

Gomes, A., E. Fernandes, M. B. Q. Garcia, A. M. S. Silva, D. C. G. A. Pinto, C. M. M. Santos, J. A. S. Cavaleiro and J. L. F. C. Lima (2008). "Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones: Relationship with the antioxidant activity." Bioorganic & Medicinal Chemistry **16**(17): 7939-7943.

- Gonzalez-Sarrias, A., M. A. Nunez-Sanchez, F. A. Tomas-Barberan and J. C. Espin (2017). "Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells." J Agric Food Chem **65**(4): 752-758.
- Goodacre, R., D. Broadhurst, A. K. Smilde, B. S. Kristal, J. D. Baker, R. Beger, C. Bessant, S. Connor, G. Capuani, A. Craig, T. Ebbels, D. B. Kell, C. Manetti, J. Newton, G. Paternostro, R. Somorjai, M. Sjöström, J. Trygg and F. Wulfert (2007). "Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics." Metabolomics **3**(3): 231-241.
- Gregorio, G. P., R. S. P. Diaz and R. J. M. Casado (2003). "Dementia and Nutrition. Intervention study in institutionalized patients with Alzheimer disease." J Nutr Health Aging **7**(5): 304-308.
- Grossi, C., S. Rigacci, S. Ambrosini, T. Ed Dami, I. Luccarini, C. Traini, P. Failli, A. Berti, F. Casamenti and M. Stefani (2013). "The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against Ass plaque pathology." PLoS One **8**(8): e71702.
- Gu, M., J. M. Cooper, J. W. Taanman and A. H. V. Schapira (1998). "Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease." Annals of Neurology **44**(2): 177-186.
- Gu, Y., J. W. Nieves, Y. Stern, J. A. Luchsinger and N. Scarmeas (2010). "Food Combination and Alzheimer Disease Risk: A Protective Diet." Archives of Neurology **67**(6): 699-706.
- Gülçin, İ. (2012). "Antioxidant activity of food constituents: an overview." Archives of Toxicology **86**(3): 345-391.
- Gülçin I., Elias R., Gepdiremen A., Taoubi K. and Köksal. E (2009). "Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)." Wood Sci Technol **43**: 195-212.
- Guldberg, H. C. and C. A. Marsden (1975). "Catechol-O-Methyl Transferase: Pharmacological Aspects and Physiological Role." Pharmacological Reviews **27**(2): 135.
- Guo, X., X. Sha, E. Rahman, Y. Wang, B. Ji, W. Wu and F. Zhou (2018). "Antioxidant capacity and amino acid profile of millet bran wine and the synergistic interaction between major polyphenols." Journal of Food Science and Technology **55**(3): 1010-1020.
- Guyot, S., J. Vercauteren and V. Cheynier (1996). "Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase." Phytochemistry **42**(5): 1279-1288.
- Halliwell, B. (2008). "Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?" Archives of Biochemistry and Biophysics **476**(2): 107-112.
- Hamilton, R. L. (2000). "Lewy Bodies in Alzheimer's Disease: A Neuropathological Review of 145 Cases Using α -Synuclein Immunohistochemistry." Brain Pathology **10**(3): 378-384.
- Hansen, L., D. Salmon, D. Galasko, E. Masliah, R. Katzman, R. DeTeresa, L. Thal, M. M. Pay, R. Hofstetter, M. Klauber and et al. (1990). "The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity." Neurology **40**(1): 1-8.

Hanson, L. R., J. M. Fine, D. B. Renner, A. L. Svitak, R. B. Burns, T. M. Nguyen, N. J. Tuttle, D. L. Marti, S. S. Panter and W. H. Frey, 2nd (2012). "Intranasal delivery of deferoxamine reduces spatial memory loss in APP/PS1 mice." Drug Deliv Transl Res **2**(3): 160-168.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.

Hassanzadeh, K., K. Akhtari, H. Hassanzadeh, S. A. Zarei, N. Fakhraei and K. Hassanzadeh (2014). "The role of structural C-H compared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropein and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: A DFT study." Food Chem. **164**: 251-258.

Hauptmann, N., J. Grimsby, J. C. Shih and E. Cadenas (1996). "The Metabolism of Tyramine by Monoamine Oxidase A/B Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA." Archives of Biochemistry and Biophysics **335**(2): 295-304.

Hauptmann, S., U. Keil, I. Scherping, A. Bonert, A. Eckert and W. E. Muller (2006). "Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease." Experimental Gerontology **41**(7): 668-673.

Hawkes, C. H., K. Del Tredici and H. Braak (2010). "A timeline for Parkinson's disease." Parkinsonism & Related Disorders **16**(2): 79-84.

He, J. B., S. J. Yuan, J. Q. Du, X. R. Hu and Y. Wang (2009). "Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity." Bioelectrochemistry **75**(2): 110-116.

Headlam, H. A. and M. J. Davies (2004). "Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products." Free Radical Biology and Medicine **36**(9): 1175-1184.

Hirai, K., G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R. L. Russell, C. S. Atwood, A. B. Johnson, Y. Kress, H. V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A. D. Cash, S. L. Siedlak, P. L. R. Harris, P. K. Jones, R. B. Petersen, G. Perry and M. A. Smith (2001). "Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease." The Journal of Neuroscience **21**(9): 3017.

Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.

Ho, Y. S., X. Yang, J. C. Lau, C. H. Hung, S. Wuwongse, Q. Zhang, J. Wang, L. Baum, K. F. So and R. C. Chang (2012). "Endoplasmic reticulum stress induces tau pathology and forms a vicious cycle: implication in Alzheimer's disease pathogenesis." J Alzheimers Dis **28**(4): 839-854.

Hodges, R. E. and D. M. Minich (2015). "Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application." Journal of nutrition and metabolism **2015**: 760689-760689.

Hotta, H., S. Nagano, M. Ueda, Y. Tsujino, J. Koyama and T. Osakai (2002). "Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation." Biochim Biophys Acta **1572**(1): 123-132.

Hunot, S., B. Brugg, D. Ricard, P. P. Michel, M. P. Muriel, M. Ruberg, B. A. Faucheux, Y. Agid and E. C. Hirsch (1997). "Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7531-7536.

Hunot, S., M. Vila, P. Teismann, R. J. Davis, E. C. Hirsch, S. Przedborski, P. Rakic and R. A. Flavell (2004). "JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(2): 665-670.

Iadecola, C. (2013). "The Pathobiology of Vascular Dementia." Neuron **80**(4): 844-866.

Ikeda, T. and K. Kano (2001). "An electrochemical approach to the studies of biological redox reactions and their applications to biosensors, bioreactors, and biofuel cells." Journal of Bioscience and Bioengineering **92**(1): 9-18.

Imlay, J. A. (2003). "Pathways of Oxidative Damage." Annual Review of Microbiology **57**(1): 395-418.

Incani, A., M. Deiana, G. Corona, K. Vafeiadou, D. Vauzour, M. A. Dessi and J. P. Spencer (2010). "Involvement of ERK, Akt and JNK signalling in H₂O₂-induced cell injury and protection by hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol." Mol Nutr Food Res **54**(6): 788-796.

Ingold, K. U. and D. A. Pratt (2014). "Advances in radical-trapping antioxidant chemistry in the 21st century: a kinetics and mechanisms perspective." Chem Rev **114**(18): 9022-9046.

Janeiro, P., I. Novak, M. Seruga and A. Maria Oliveira-Brett (2007). "Electroanalytical Oxidation of p-Coumaric Acid." Analytical Letters **40**(17): 3309-3321.

Janeiro, P. and A. M. Oliveira Brett (2004). "Catechin electrochemical oxidation mechanisms." Analytica Chimica Acta **518**(1-2): 109-115.

Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(4): 368-376.

Jemai, H., A. El Feki and S. Sayadi (2009). "Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats." J Agric Food Chem **57**(19): 8798-8804.

Jones, D. P. (2008). "Radical-free biology of oxidative stress." American journal of physiology. Cell physiology **295**(4): C849-C868.

Jones, D. P. and H. Sies (2015). "The Redox Code." Antioxidants & redox signaling **23**(9): 734-746.

José G. Fernández-Bolaños, Ó. L., M. Ángeles López-García and Azucena Maset (2012). Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, IntechOpen.

Jovanovic, S. V. and M. G. Simic (2000). "Antioxidants in Nutrition." Annals of the New York Academy of Sciences **899**(1): 326-334.

Ju, Y.-E. S., B. P. Lucey and D. M. Holtzman (2014). "Sleep and Alzheimer disease pathology--a bidirectional relationship." Nature reviews. Neurology **10**(2): 115-119.

Ju, Y. E. S., S. J. Ooms, C. Sutphen, S. L. Macauley, M. A. Zangrilli, G. Jerome, A. M. Fagan, E. Mignot, J. M. Zempel, J. A. Claassen and D. M. Holtzman (2017). Slow wave sleep disruption increases cerebrospinal fluid amyloid- β levels. Brain **140**: 2104-2111.

Kadoma, Y. and S. Fujisawa (2008). "A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method." Molecules **13**(10): 2488-2499.

Kadoma, Y. and S. Fujisawa (2008). "A Comparative Study of the Radical-scavenging Activity of the Phenolcarboxylic Acids Caffeic Acid, p-Coumaric Acid, Chlorogenic Acid and Ferulic Acid, With or Without 2-Mercaptoethanol, a Thiol, Using the Induction Period Method." Molecules **13**(10).

Kaim, W. and J. Fiedler (2009). "Spectroelectrochemistry: the best of two worlds." Chem Soc Rev **38**(12): 3373-3382.

Kaleh, Z. and S. U. Geißen (2016). "Selective isolation of valuable biophenols from olive mill wastewater." Journal of Environmental Chemical Engineering **4**(1): 373-384.

Kalia, L. V. and A. E. Lang (2015). "Parkinson's disease." The Lancet **386**(9996): 896-912.

Kalt, W., J. B. Blumberg, J. E. McDonald, M. R. Vinqvist-Tymchuk, S. A. E. Fillmore, B. A. Graf, J. M. O'Leary and P. E. Milbury (2008). "Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(3): 705-712.

Kalyanaraman, B., P. Hintz and R. C. Sealy (1986). "An electron spin resonance study of free radicals from catechol estrogens." Federation proceedings **45**(10): 2477-2484.

Kanninen, K., R. Heikkinen, T. Malm, T. Rolova, S. Kuhmonen, H. Leinonen, S. Yla-Herttuala, H. Tanila, A. L. Levenon, M. Koistinaho and J. Koistinaho (2009). "Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16505-16510.

Kanninen, K., T. M. Malm, H. K. Jyrkkanen, G. Goldsteins, V. Keksa-Goldsteine, H. Tanila, M. Yamamoto, S. Yla-Herttuala, A. L. Levenon and J. Koistinaho (2008). "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid." Mol Cell Neurosci **39**(3): 302-313.

Kanoski, S. E. and T. L. Davidson (2011). "Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity." Physiology & Behavior **103**(1): 59-68.

Karch, C. M. and A. M. Goate (2015). "Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis." Biol Psychiatry **77**(1): 43-51.

Katase, T. and J.-M. Bollag (1991). "TRANSFORMATION OF TRANS-4-HYDROXYCINNAMIC ACID BY A LACCASE OF THE FUNGUS TRAMETES VERSICOLOR: ITS SIGNIFICANCE IN HUMIFICATION." Soil Science **151**(4).

Kazee, A. M. and L. Y. Han (1995). "Cortical Lewy bodies in Alzheimer's disease." Archives of pathology & laboratory medicine **119**(5): 448-453.

Keller, J. N., F. A. Schmitt, S. W. Scheff, Q. Ding, Q. Chen, D. A. Butterfield and W. R. Markesbery (2005). "Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment." Neurology **64**(7): 1152-1156.

Keyer, K. and J. A. Imlay (1996). "Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(24): 13635-13640.

Keys, A., A. Menotti, M. J. Karvonen, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, B. S. Djordjevic, A. S. Dontas, F. Fidanza, M. H. Keys and et al. (1986). "The diet and 15-year death rate in the seven countries study." Am J Epidemiol **124**(6): 903-915.

Khymenets, O., M. Fito, S. Tourino, D. Munoz-Aguayo, M. Pujadas, J. L. Torres, J. Joglar, M. Farre, M. I. Covas and R. de la Torre (2010). "Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion." Drug Metab Dispos **38**(9): 1417-1421.

Kim, H. B., S. Lee, E. S. Hwang, S. Maeng and J. H. Park (2017). "p-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments." Biochem Biophys Res Commun **492**(3): 493-499.

Kim, S. J. and Y. Han (2005). "Insulin inhibits AMPA-induced neuronal damage via stimulation of protein kinase B (Akt)." Journal of Neural Transmission **112**(2): 179-191.

Kind, T., M. Scholz and O. Fiehn (2009). "How Large Is the Metabolome? A Critical Analysis of Data Exchange Practices in Chemistry." PLOS ONE **4**(5): e5440.

Kirchner, S. C., S. E. Hallagan, F. M. Farin, J. Dilley, P. Costa-Mallen, T. Smith-Weller, G. M. Franklin, P. D. Swanson and H. Checkoway (2000). "Mitochondrial ND1 sequence analysis and association of the T4216C mutation with Parkinson's disease." NeuroToxicology **21**(4): 441-445.

Knoops, K. T. B., L. C. P. G. M. de Groot, D. Kromhout, A.-E. Perrin, O. Moreiras-Varela, A. Menotti and W. A. van Staveren (2004). "Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and WomenThe HALE Project." JAMA **292**(12): 1433-1439.

Konishi, Y., Y. Hitomi and E. Yoshioka (2004). "Intestinal Absorption of p-Coumaric and Gallic Acids in Rats after Oral Administration." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(9): 2527-2532.

Konstantinidou, V., M.-I. Covas, D. Muñoz-Aguayo, O. Khymenets, R. de la Torre, G. Saez, M. d. C. Tormos, E. Toledo, A. Marti, V. Ruiz-Gutiérrez, M. V. R. Mendez and M. Fito (2010). "In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial." The FASEB Journal **24**(7): 2546-2557.

Kort, R., H. Vonk, X. Xu, W. D. Hoff, W. Crielaard and K. J. Hellingwerf (1996). "Evidence for trans-cis isomerization of the p-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein." FEBS Letters **382**(1): 73-78.

Kostomoiri, M., A. Fragkouli, M. Sagnou, L. A. Skaltsounis, M. Pelecanou, E. C. Tsilibary and A. K. Tzinia (2013). "Oleuropein, an Anti-oxidant Polyphenol Constituent of Olive Promotes alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (A beta PP)." Cellular and Molecular Neurobiology **33**(1): 147-154.

Kotronoulas, A., N. Pizarro, A. Serra, P. Robledo, J. Joglar, L. Rubió, Á. Hernaéz, C. Tormos, M. J. Motilva, M. Fitó, M.-I. Covas, R. Solà, M. Farré, G. Saez and R. de la Torre (2013). "Dose-dependent metabolic disposition of hydroxytyrosol and formation of mercapturates in rats." Pharmacological Research **77**: 47-56.

Koyama, A., D. K. Houston, E. M. Simonsick, J. S. Lee, H. N. Ayonayon, D. R. Shahar, C. Rosano, S. Satterfield and K. Yaffe (2015). "Association between the Mediterranean diet and cognitive decline in a biracial population." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **70**(3): 354-359.

Krstic, D., A. Madhusudan, J. Doehner, P. Vogel, T. Notter, C. Imhof, A. Manalastas, M. Hilfiker, S. Pfister, C. Schwerdel, C. Riether, U. Meyer and I. Knuesel (2012). "Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice." Journal of Neuroinflammation **9**(1): 151.

Kwon, S. M., S. I. Kim, D. C. Chun, N. H. Cho, B. C. Chung, B. W. Park and S. J. Hong (2001). "Development of rat prostatitis model by oral administration of isoflavone and its characteristics." Yonsei Med J **42**(4): 395-404.

Lashuel, H. A., C. R. Overk, A. Oueslati and E. Masliah (2013). "The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target." Nature reviews. Neuroscience **14**(1): 38-48.

Le Bourvellec, C., D. Hauchard, A. Darchen, J. L. Burgot and M. L. Abasq (2008). "Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids." Talanta **75**(4): 1098-1103.

Le Deun, E., R. Van der Werf, G. Le Bail, J.-M. Le Quéré and S. Guyot (2015). "HPLC-DAD-MS Profiling of Polyphenols Responsible for the Yellow-Orange Color in Apple Juices of Different French Cider Apple Varieties." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(35): 7675-7684.

Leatham, G. F., V. King and M. A. Stahmann (1980). "In Vitro Protein Polymerization by Quinones or Free Radicals Generated by Plant or Fungal Oxidative enzymes." The American Phytopathological Society **70**(12): 1134-1140.

Lee, B., I. Shim, H. Lee and D. H. Hahm (2018). "Effect of oleuropein on cognitive deficits and changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cytokine expression in a rat model of post-traumatic stress disorder." J Nat Med **72**(1): 44-56.

Lee, M. J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F. Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr and C. S. Yang (2002). "Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(10 Pt 1): 1025-1032.

Lee, M. J., Z. Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine and C. S. Yang (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **4**(4): 393.

Lee, O. H. and B. Y. Lee (2010). "Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract." Bioresour Technol **101**(10): 3751-3754.

Lemche, E. (2018). "Early Life Stress and Epigenetics in Late-onset Alzheimer's Dementia: A Systematic Review." Curr Genomics **19**(7): 522-602.

Lenaz, G., C. Bovina, M. D'Aurelio, R. Fato, G. Formiggini, M. L. Genova, G. Giuliano, M. M. Pich, U. G. O. Paolucci, G. P. Castelli and B. Ventura (2002). "Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Aging." Annals of the New York Academy of Sciences **959**(1): 199-213.

Leonarduzzi, G., B. Sottero and G. Poli (2010). "Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited." Pharmacol Ther **128**(2): 336-374.

Leopoldini, M., T. Marino, N. Russo and M. Toscano (2004). "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism." The Journal of Physical Chemistry A **108**(22): 4916-4922.

Leri, M., R. Oropesa-Nunez, C. Canale, S. Raimondi, S. Giorgetti, E. Bruzzone, V. Bellotti, M. Stefani and M. Bucciantini (2018). "Oleuropein aglycone: A polyphenol with different targets against amyloid toxicity." Biochim Biophys Acta Gen Subj **1862**(6): 1432-1442.

Li, G., M. J. Simon, L. M. Cancel, Z. D. Shi, X. Ji, J. M. Tarbell, B. Morrison, 3rd and B. M. Fu (2010). "Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies." Ann Biomed Eng **38**(8): 2499-2511.

Lin, Q., Q. Li, C. Batchelor-McAuley and R. G. Compton (2015). "Two-Electron, Two-Proton Oxidation of Catechol: Kinetics and Apparent Catalysis." The Journal of Physical Chemistry C **119**(3): 1489-1495.

Lipton, S. A., T. Rezaie, A. Nutter, K. M. Lopez, J. Parker, K. Kosaka, T. Satoh, S. R. McKercher, E. Masliah and N. Nakanishi (2016). "Therapeutic advantage of pro-electrophilic drugs to activate the Nrf2/ARE pathway in Alzheimer's disease models." Cell Death Dis **7**(12): e2499.

Liu, L., K. S. Ahn, M. K. Shanmugam, H. Wang, H. Shen, F. Arfuso, A. Chinnathambi, S. A. Alharbi, Y. Chang, G. Sethi and F. R. Tang (2018). "Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF-kappaB activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells." J Cell Biochem.

Liu, R. H. (2004). "Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action." The Journal of Nutrition **134**(12): 3479S-3485S.

Liu, Z., T. Li, P. Li, N. Wei, Z. Zhao, H. Liang, X. Ji, W. Chen, M. Xue and J. Wei (2015). "The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease." Oxidative medicine and cellular longevity **2015**: 352723-352723.

Livingston, G., A. Sommerlad, V. Orgeta, S. G. Costafreda, J. Huntley, D. Ames, C. Ballard, S. Banerjee, A. Burns, J. Cohen-Mansfield, C. Cooper, N. Fox, L. N. Gitlin, R. Howard, H. C. Kales, E. B. Larson, K. Ritchie, K. Rockwood, E. L. Sampson, Q. Samus, L. S. Schneider, G. Selbaek, L. Teri and N. Mukadam (2017). "Dementia prevention, intervention, and care." Lancet **390**(10113): 2673-2734.

Loeffler, D. A., J. R. Connor, P. L. Juneau, B. S. Snyder, L. Kanaley, A. J. DeMaggio, H. Nguyen, C. M. Brickman and P. A. LeWitt (1995). "Transferrin and Iron in Normal, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease Brain Regions." Journal of Neurochemistry **65**(2): 710-716.

Long, L. H., A. Hoi and B. Halliwell (2010). "Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media." Arch Biochem Biophys **501**(1): 162-169.

Longo, E., K. Morozova and M. Scampicchio (2017). "Effect of light irradiation on the antioxidant stability of oleuropein." Food Chem **237**: 91-97.

López de las Hazas, M.-C., J. Godinho-Pereira, A. Macià, A. F. Almeida, M. R. Ventura, M.-J. Motilva and C. N. Santos (2018). "Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells." Journal of Functional Foods **46**: 110-117.

López de las Hazas, M.-C., C. Piñol, A. Macià, M.-P. Romero, A. Pedret, R. Solà, L. Rubió and M.-J. Motilva (2016). "Differential absorption and metabolism of hydroxytyrosol and its precursors oleuropein and secoiridoids." Journal of Functional Foods **22**: 52-63.

Lopez, S., B. Bermudez, S. Montserrat-de la Paz, S. Jaramillo, L. M. Varela, A. Ortega-Gomez, R. Abia and F. J. G. Muriana (2014). "Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1838**(6): 1638-1656.

Lopez, S., S. Montserrat-de la Paz, R. Lucas, B. Bermudez, R. Abia, J. C. Morales and F. J. G. Muriana (2017). "Effect of metabolites of hydroxytyrosol on protection against oxidative stress and inflammation in human endothelial cells." Journal of Functional Foods **29**: 238-247.

Loru, D., A. Incani, M. Deiana, G. Corona, A. Atzeri, M. P. Melis, A. Rosa and M. A. Dessì (2009). "Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells." Toxicology and Industrial Health **25**(4-5): 301-310.

Lovell, M. A., S. Xiong, C. Xie, P. Davies and W. R. Markesbery (2004). "Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3." J Alzheimers Dis **6**(6): 659-671; discussion 673-681.

Lozano-Sánchez, J., E. Giambanelli, R. Quirantes-Piné, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez (2011). "Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(21): 11491-11500.

Luceri, C., E. Bigagli, V. Pitozzi and L. Giovannelli (2017). "A nutrigenomics approach for the study of anti-aging interventions: olive oil phenols and the modulation of gene and microRNA expression profiles in mouse brain." Eur J Nutr **56**(2): 865-877.

Lund, H. and M. Baizer (1991). Organic Electrochemistry, An Introduction and a Guide, Third edition, Dekker, M.: 616.

Lushchak, V. I. (2012). "Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions." J Amino Acids **2012**: 736837.

Lushchak, V. I. (2014). "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." Chemico-Biological Interactions **224**: 164-175.

Ma, X., H. Li, J. Dong and W. Qian (2011). "Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of phenolic acids by employing gold nanoshells precursor composites as nanoprobos." Food Chemistry **126**(2): 698-704.

- Ma, X. H., C. J. Zheng, L. Y. Han, B. Xie, J. Jia, Z. W. Cao, Y. X. Li and Y. Z. Chen (2009). "Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives." Drug Discovery Today **14**(11): 579-588.
- Madrona, A., G. Pereira-Caro, L. Bravo, R. Mateos and J. L. Espartero (2011). "Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers." Food Chem **129**(3): 1169-1178.
- Magalhães, T. N. C., M. Weiler, C. V. L. Teixeira, T. Hayata, A. S. Moraes, V. O. Boldrini, L. M. dos Santos, B. M. de Campos, T. J. R. de Rezende, H. P. G. Joaquim, L. L. Talib, O. V. Forlenza, F. Cendes and M. L. F. Balthazar (2018). "Systemic Inflammation and Multimodal Biomarkers in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease." Molecular Neurobiology **55**(7): 5689-5697.
- Malik, N. S. A. and J. M. Bradford (2008). "Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves." Journal of Food, Agriculture and Environment **6**(2): 8-13.
- Mallajosyula, J. K., D. Kaur, S. J. Chinta, S. Rajagopalan, A. Rane, D. G. Nicholls, D. A. Di Monte, H. Macarthur and J. K. Andersen (2008). "MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology." PloS one **3**(2): e1616-e1616.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**(5): 727-747.
- Mangialasche, F., W. Xu, M. Kivipelto, E. Costanzi, S. Ercolani, M. Pigliautile, R. Cecchetti, M. Baglioni, A. Simmons, H. Soininen, M. Tsolaki, I. Kloszewska, B. Vellas, S. Lovestone and P. Mecocci (2012). "Tocopherols and tocotrienols plasma levels are associated with cognitive impairment." Neurobiol Aging **33**(10): 2282-2290.
- Mann, V. M., J. M. Cooper, D. Krige, S. E. Daniel, A. H. Schapira and C. D. Marsden (1992). "Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease." Brain **115 (Pt 2)**: 333-342.
- Manna, C., D. Napoli, G. Cacciapuoti, M. Porcelli and V. Zappia (2009). "Olive Oil Phenolic Compounds Inhibit Homocysteine-Induced Endothelial Cell Adhesion Regardless of Their Different Antioxidant Activity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(9): 3478-3482.
- Manna, C., L. Tagliafierro, I. Scala, B. Granese, G. Andria and V. Zappia (2012). "The Role of Iron Toxicity in Oxidative Stress-induced Cellular Degeneration in Down Syndrome: Protective Effects of Phenolic Antioxidants." Current Nutrition & Food Science **8**(3): 206-212.
- Männikkö, R., P. Komulainen, U. Schwab, H. M. Heikkilä, K. Savonen, M. Hassinen, T. Hänninen, M. Kivipelto and R. Rauramaa (2015). "The Nordic diet and cognition – The DR's EXTRA Study." British Journal of Nutrition **114**(2): 231-239.
- Mark, R. J., M. A. Lovell, W. R. Markesbery, K. Uchida and M. P. Mattson (1997). "A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β -Peptide." Journal of Neurochemistry **68**(1): 255-264.
- Markham, K. R. (1982). Techniques of Flavonoids Identification. London.

Marrugat, J., M. I. Covas, M. Fito, H. Schroder, E. Miro-Casas, E. Gimeno, M. C. Lopez-Sabater, R. de la Torre and M. Farre (2004). "Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial." Eur J Nutr **43**(3): 140-147.

Martin-Vertedor, D., M. Garrido, J. A. Pariente, J. Espino and J. Delgado-Adamez (2016). "Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value." Phytother Res **30**(7): 1172-1179.

Martin, L., X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M.-L. Perrin and F. Terro (2013). "Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A." Ageing Research Reviews **12**(1): 39-49.

Martin, L., X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M.-L. Perrin, C. Yardin and F. Terro (2013). "Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease." Ageing Research Reviews **12**(1): 289-309.

Martinez-Gonzalez, M. A. and N. Martin-Calvo (2016). "Mediterranean diet and life expectancy; beyond olive oil, fruits, and vegetables." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **19**(6): 401-407.

Martínez-González Miguel, A., A. Gea and M. Ruiz-Canela (2019). "The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health." Circulation Research **124**(5): 779-798.

Martinez-Lapiscina, E. H., P. Clavero, E. Toledo, R. Estruch, J. Salas-Salvado, B. San Julian, A. Sanchez-Tainta, E. Ros, C. Valls-Pedret and M. A. Martinez-Gonzalez (2013). "Mediterranean diet improves cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomised trial." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(12): 1318-1325.

Martinez-Lapiscina, E. H., P. Clavero, E. Toledo, B. San Julian, A. Sanchez-Tainta, D. Corella, R. M. Lamuela-Raventos, J. A. Martinez and M. A. Martinez-Gonzalez (2013). "Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: the PREDIMED-NAVARRA randomized, trial." J Nutr Health Aging **17**(6): 544-552.

Martinez-Revelles, S., M. S. Avendano, A. B. Garcia-Redondo, Y. Alvarez, A. Aguado, J. V. Perez-Giron, L. Garcia-Redondo, V. Esteban, J. M. Redondo, M. J. Alonso, A. M. Briones and M. Salaices (2013). "Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension." Antioxid Redox Signal **18**(1): 51-65.

Martins, N., L. Barros and I. C. F. R. Ferreira (2016). "In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps." Trends in Food Science & Technology **48**: 1-12.

Massion, P., J.-C. Preiser and J.-L. Balligand (2002). "Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ?" Nutrition Clinique et Métabolisme **16**(4): 248-252.

Mataix, J., J. J. Ochoa and J. L. Quiles (2004). "Olive oil, dietary fat and ageing, a mitochondrial approach." Grasas Y Aceites **55**(1): 84-91.

Mateos, R., M. Trujillo, G. Pereira-Caro, A. Madrona, A. Cert and J. L. Espartero (2008). "New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters." J Agric Food Chem **56**(22): 10960-10966.

Mathew, S., T. E. Abraham and Z. A. Zakaria (2015). "Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions." J Food Sci Technol **52**(9): 5790-5798.

Mazziotti, A., F. Mazzotti, M. Pantusa, L. Sportelli and G. Sindona (2006). "Pro-oxidant Activity of Oleuropein Determined in Vitro by Electron Spin Resonance Spin-Trapping Methodology." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(20): 7444-7449.

McDonald, S., P. D. Prenzler, M. Antolovich and K. Robards (2001). "Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts." Food Chemistry **73**(1): 73-84.

McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes and E. G. McGeer (1988). "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains." Neurology **38**(8): 1285-1291.

Mecocci, P., U. MacGarvey, A. E. Kaufman, D. Koontz, J. M. Shoffner, D. C. Wallace and M. F. Beal (1993). "Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain." Ann Neurol **34**(4): 609-616.

Mellick, M. T. and D. George (2016). "A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2."

Melov, S., P. A. Adlard, K. Morten, F. Johnson, T. R. Golden, D. Hinerfeld, B. Schilling, C. Mavros, C. L. Masters, I. Volitakis, Q.-X. Li, K. Laughton, A. Hubbard, R. A. Cherny, B. Gibson and A. I. Bush (2007). "Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau." PLoS One **2**(6): No pp. given.

Messina, M., J. W. Lampe, D. F. Birt, L. J. Appel, E. Pivonka, B. Berry and D. R. Jacobs (2001). "Reductionism and the Narrowing Nutrition Perspective: Time for Reevaluation and Emphasis on Food Synergy." Journal of the American Dietetic Association **101**(12): 1416-1419.

Meyer, T. J., M. H. Huynh and H. H. Thorp (2007). "The possible role of proton-coupled electron transfer (PCET) in water oxidation by photosystem II." Angew Chem Int Ed Engl **46**(28): 5284-5304.

Migliore, L., I. Fontana, F. Trippi, R. Colognato, F. Coppede, G. Tognoni, B. Nucciarone and G. Siciliano (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." Neurobiol Aging **26**(5): 567-573.

Milbury, P. E. and W. Kalt (2010). "Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(7): 3950-3956.

Miquel, J., A. C. Economos, J. Fleming and J. E. Johnson (1980). "Mitochondrial role in cell aging." Experimental Gerontology **15**(6): 575-591.

Miyata, M. and J. D. Smith (1996). "Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides." Nat Genet **14**(1): 55-61.

Mochizuki, M., S.-i. Yamazaki, K. Kano and T. Ikeda (2002). "Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1569**(1): 35-44.

Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami and T. Nagatsu (1994). "Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients." Neurosci Lett **180**(2): 147-150.

Mogi, M., M. Harada, P. Riederer, H. Narabayashi, K. Fujita and T. Nagatsu (1994). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients." Neurosci Lett **165**(1-2): 208-210.

Mogi, M., T. Kondo, Y. Mizuno and T. Nagatsu (2007). "p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain." Neurosci Lett **414**(1): 94-97.

Mohammad-Beigi, H., F. Aliakbari, C. Sahin, C. Lomax, A. Tawfike, N. P. Schafer, A. Amiri-Nowdijeh, H. Eskandari, I. M. Moller, M. Hosseini-Mazinani, G. Christiansen, J. L. Ward, D. Morshedi and D. E. Otzen (2019). "Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce alpha-synuclein fibrillation and oligomer toxicity." J Biol Chem.

Mohammad, M., A. Y. Khan, M. S. Subhani, N. Bibi, S. Ahmad and S. Saleemi (2001). "Kinetics and electrochemical studies on superoxide." Research on Chemical Intermediates **27**(3): 259-267.

Molino, S., M. Dossena, D. Buonocore, F. Ferrari, L. Venturini, G. Ricevuti and M. Verri (2016). "Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials." Life Sciences **161**: 69-77.

Monks, T. J. and S. S. Lau (1997). "Biological Reactivity of polyphenolic-glutathione conjugates." Chem Res Toxicol(10): 1296-1313.

Monti, M. C., L. Margarucci, R. Riccio and A. Casapullo (2012). "Modulation of Tau Protein Fibrillization by Oleocanthal." Journal of Natural Products **75**(9): 1584-1588.

Montserrat-de la Paz, S., B. Bermudez, M. P. Cardelo, S. Lopez, R. Abia and F. J. G. Muriana (2016). "Olive oil and postprandial hyperlipidemia: implications for atherosclerosis and metabolic syndrome." Food & Function **7**(12): 4734-4744.

Morris, M. C., C. C. Tangney, Y. Wang, F. M. Sacks, L. L. Barnes, D. A. Bennett and N. T. Aggarwal (2015). "MIND diet slows cognitive decline with aging." Alzheimers Dement **11**(9): 1015-1022.

Morris, M. C., C. C. Tangney, Y. Wang, F. M. Sacks, D. A. Bennett and N. T. Aggarwal (2015). "MIND diet associated with reduced incidence of Alzheimer's disease." Alzheimer's & Dementia **11**(9): 1007-1014.

Mortiboys, H., K. K. Johansen, J. O. Aasly and O. Bandmann (2010). "Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2." Neurology **75**(22): 2017-2020.

Moussa, C., M. Hebron, X. Huang, J. Ahn, R. A. Rissman, P. S. Aisen and R. S. Turner (2017). "Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease." J Neuroinflammation **14**(1): 1.

Munoz-Rugeles, L. and J. R. Alvarez-Idaboy (2015). "A proton-electron sequential transfer mechanism: theoretical evidence about its biological relevance." Phys Chem Chem Phys **17**(43): 28525-28528.

Muriana, F. J. G., S. Montserrat-de la Paz, R. Lucas, B. Bermudez, S. Jaramillo, J. C. Morales, R. Abia and S. Lopez (2017). "Tyrosol and its metabolites as antioxidative and anti-inflammatory molecules in human endothelial cells." Food Funct **8**(8): 2905-2914.

Musiek, E. S., M. M. Lim, G. Yang, A. Q. Bauer, L. Qi, Y. Lee, J. H. Roh, X. Ortiz-Gonzalez, J. T. Dearborn, J. P. Culver, E. D. Herzog, J. B. Hogenesch, D. F. Wozniak, K. Dikranian, B. I. Giasson, D. R. Weaver, D. M. Holtzman and G. A. FitzGerald (2013). "Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration." Journal of Clinical Investigation **123**(12): 5389-5400.

Nady, H., M. M. El-Rabiei and G. M. A. El-Hafez (2017). "Electrochemical oxidation behavior of some hazardous phenolic compounds in acidic solution." Egyptian Journal of Petroleum **26**(3): 669-678.

Nair, S., S. T. Doh, J. Y. Chan, A. N. Kong and L. Cai (2008). "Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis." Br J Cancer **99**(12): 2070-2082.

Napolitano, A., M. De Lucia, L. Panzella and M. d'Ischia (2010). Chapter 134 - The Chemistry of Tyrosol and Hydroxytyrosol: Implications for Oxidative Stress A2 - Preedy, Victor R. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. R. R. Watson. San Diego, Academic Press: 1225-1232.

Nardini, M., M. D'Aquino, G. Tomassi, V. Gentili, M. Di Felice and C. Scaccini (1995). "Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives." Free Radical Biology and Medicine **19**(5): 541-552.

Nematollahia, D., M. Rafieeb and L. Fotouhic (2009). "Mechanistic Study of Homogeneous Reactions Coupled with Electrochemical Oxidation of Catechols." J. Iran. Chem. Soc. **6**: 448-476.

Newair, E. F., P. A. Kilmartin and F. Garcia (2018). "Square wave voltammetric analysis of polyphenol content and antioxidant capacity of red wines using glassy carbon and disposable carbon nanotubes modified screen-printed electrodes." European Food Research and Technology **244**(7): 1225-1237.

NIH. (2019). "Cognitive Health and Older Adults." from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Niki, E., Y. Yoshida, Y. Saito and N. Noguchi (2005). "Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects." Biochemical and Biophysical Research Communications **338**(1): 668-676.

Nunomura, A., P. I. Moreira, H. G. Lee, X. Zhu, R. J. Castellani, M. A. Smith and G. Perry (2007). "Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases." CNS Neurol Disord Drug Targets **6**(6): 411-423.

Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 759-767.

O'Neill, L. A. and C. Kaltschmidt (1997). "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function." Trends Neurosci **20**(6): 252-258.

Obied, H. K., P. D. Prenzler, D. Ryan, M. Servili, A. Taticchi, S. Esposto and K. Robards (2008). "Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L." Nat Prod Rep **25**(6): 1167-1179.

Odiatou, E. M., A. L. Skaltsounis and A. I. Constantinou (2013). "Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol." Cancer Letters **330**(1): 113-121.

Oertel, W. H. (2017). "Recent advances in treating Parkinson's disease." F1000Research **6**: 260-260.

Ogburn, K. D., T. Bottiglieri, Z. Wang and M. E. Figueiredo-Pereira (2006). "Prostaglandin J2 reduces catechol-O-methyltransferase activity and enhances dopamine toxicity in neuronal cells." Neurobiology of Disease **22**(2): 294-301.

Ojaimi, J., C. L. Masters, K. Opeskin, P. McKelvie and E. Byrne (1999). "Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age." Mechanisms of Ageing and Development **111**(1): 39-47.

Okado-Matsumoto, A. and I. Fridovich (2000). "The Role of α,β -Dicarbonyl Compounds in the Toxicity of Short Chain Sugars." Journal of Biological Chemistry **275**(45): 34853-34857.

Oliveras-López, M.-J., G. Berná, E. Jurado-Ruiz, H. López-García de la Serrana and F. Martín (2014). "Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults." Journal of Functional Foods **10**: 475-484.

Olsson, E., B. Karlstrom, L. Kilander, L. Byberg, T. Cederholm and P. Sjogren (2015). "Dietary patterns and cognitive dysfunction in a 12-year follow-up study of 70 year old men." J Alzheimers Dis **43**(1): 109-119.

Omar, S. H. (2010). "Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive." Saudi Pharm J **18**(3): 111-121.

OMS. (2016, 2016-10-03 12:05:11). "OMS | Faits marquants sur le vieillissement." WHO, from <https://www.who.int/ageing/about/facts/fr/>.

OMS. (2017). "La Démence." 2017-03-05, from <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

Ota, A., H. Abramovi, V. Abram and N. Ulrih (2011). Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes.

Owen R. W., W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spiegelhalder and H. Bartsch (2000). "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene." Food and Chemical Toxicology **38**(8): 647-659.

Padurariu, M., A. Ciobica, L. Hritcu, B. Stoica, W. Bild and C. Stefanescu (2010). "Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." Neurosci Lett **469**(1): 6-10.

Paiva-Martins, F. and M. H. Gordon (2005). "Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds." J Agric Food Chem **53**(7): 2704-2709.

Paiva-Martins, F., M. H. Gordon and P. Gameiro (2003). "Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes." Chemistry and Physics of Lipids **124**(1): 23-36.

Paka, G. D. and C. Ramassamy (2017). "Optimization of Curcumin-Loaded PEG-PLGA Nanoparticles by GSH Functionalization: Investigation of the Internalization Pathway in Neuronal Cells." Mol Pharm **14**(1): 93-106.

Palazzi, L., E. Bruzzone, G. Bisello, M. Leri, M. Stefani, M. Bucciantini and P. Polverino de Laureto (2018). "Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric alpha-synuclein and favours the growth of non-toxic aggregates." Sci Rep **8**(1): 8337.

Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos and C. Stefanadis (2006). "Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk." Nutr Metab Cardiovasc Dis **16**(8): 559-568.

Pantano, D., I. Luccarini, P. Nardiello, M. Servili, M. Stefani and F. Casamenti (2017). "Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology." Br J Clin Pharmacol **83**(1): 54-62.

Paradiso, V. M., C. Di Mattia, M. Giarnetti, M. Chiarini, L. Andrich and F. Caponio (2016). "Antioxidant Behavior of Olive Phenolics in Oil-in-Water Emulsions." J Agric Food Chem **64**(29): 5877-5886.

Parihar, M. S., A. Parihar, M. Fujita, M. Hashimoto and P. Ghafourifar (2009). "Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 2015-2024.

Parizad, P. A., J. Capraro, A. Scarafoni, F. Bonomi, M. Blandino, M. Marengo, D. Giordano, A. Carpen and S. Iametti (2019). "The Bio-Functional Properties of Pigmented Cereals may Involve Synergies among Different Bioactive Species." Plant Foods for Human Nutrition **74**(1): 128-134.

Park, J., J. S. Min, U. Chae, J. Y. Lee, K. S. Song, H. S. Lee, H. J. Lee, S. R. Lee and D. S. Lee (2017). "Anti-inflammatory effect of oleuropein on microglia through regulation of Drp1-dependent mitochondrial fission." J Neuroimmunol **306**: 46-52.

Parr, A. J. and G. P. Bolwell (2000). "Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(7): 985-1012.

Parvez, S., M. J. C. Long, J. R. Poganik and Y. Aye (2018). "Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants." Chemical Reviews **118**(18): 8798-8888.

Pasban-Aliabadi, H., S. Esmaili-Mahani, V. Sheibani, M. Abbasnejad, A. Mehdizadeh and M. M. Yaghoobi (2013). "Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein." Rejuvenation Res **16**(2): 134-142.

Pasinetti, G. M., R. Singh, S. Westfall, F. Herman, J. Faith and L. Ho (2018). "The Role of the Gut Microbiota in the Metabolism of Polyphenols as Characterized by Gnotobiotic Mice." Journal of Alzheimer's disease : JAD **63**(2): 409-421.

Pei, K., J. Ou, J. Huang and S. Ou (2016). "p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities." J Sci Food Agric **96**(9): 2952-2962.

Pelletier, A., C. Barul, C. Feart, C. Helmer, C. Bernard, O. Periot, B. Dilharreguy, J. F. Dartigues, M. Allard, P. Barberger-Gateau, G. Catheline and C. Samieri (2015). "Mediterranean diet and preserved brain structural connectivity in older subjects." Alzheimers Dement **11**(9): 1023-1031.

Peng, S., B. Zhang, J. Yao, D. Duan and J. Fang (2015). "Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells." Food Funct **6**(6): 2091-2100.

Peng, X. M., L. Gao, S. X. Huo, X. M. Liu and M. Yan (2015). "The Mechanism of Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in the Senescent Mouse Model Induced by a Combination of D-gal and AlCl₃." Phytother Res **29**(8): 1137-1144.

Peng, Y., C. Hou, Z. Yang, C. Li, L. Jia, J. Liu, Y. Tang, L. Shi, Y. Li, J. Long and J. Liu (2016). "Hydroxytyrosol mildly improve cognitive function independent of APP processing in APP/PS1 mice." Mol Nutr Food Res **60**(11): 2331-2342.

Perez-Mana, C., M. Farre, M. Pujadas, C. Mustata, E. Menoyo, A. Pastor, K. Langohr and R. de la Torre (2015). "Ethanol induces hydroxytyrosol formation in humans." Pharmacol Res **95-96**: 27-33.

Perez-Martinez, P., J. Lopez-Miranda, L. Blanco-Colio, C. Bellido, Y. Jimenez, J. A. Moreno, J. Delgado-Lista, J. Egido and F. Perez-Jimenez (2007). "The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor κ B activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men." Atherosclerosis **194**(2): e141-e146.

Perron, N. R., H. C. Wang, S. N. Deguire, M. Jenkins, M. Lawson and J. L. Brumaghim (2010). "Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding." Dalton Trans **39**(41): 9982-9987.

Petrella, J. R., R. E. Coleman and P. M. Doraiswamy (2003). "Neuroimaging and Early Diagnosis of Alzheimer Disease: A Look to the Future." Radiology **226**(2): 315-336.

Petrucci, R., P. Astolfi, L. Greci, O. Firuzi, L. Saso and G. Marrosu (2007). "A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium." Electrochimica Acta **52**(7): 2461-2470.

Peyrat-Maillard, M. N., M. E. Cuvelier and C. Berset (2003). "Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)-Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects." JAOCS, **80**(10): 1007-1012.

Pierce, E. N., S. C. Piyankarage, T. Dunlap, V. Litosh, M. I. Siklos, Y. T. Wang and G. R. Thatcher (2016). "Prodrugs Bioactivated to Quinones Target NF- κ B and Multiple Protein Networks: Identification of the Quinonome." Chem Res Toxicol **29**(7): 1151-1159.

Pimpão, R. C., M. R. Ventura, R. B. Ferreira, G. Williamson and C. N. Santos (2015). "Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée." British Journal of Nutrition **113**(3): 454-463.

Pitozzi, V., M. Jacomelli, D. Catelan, M. Servili, A. Taticchi, A. Biggeri, P. Dolara and L. Giovannelli (2012). "Long-Term Dietary Extra-Virgin Olive Oil Rich in Polyphenols Reverses Age-Related Dysfunctions in Motor Coordination and Contextual Memory in Mice: Role of Oxidative Stress." Rejuvenation Research **15**(6): 601-612.

Pitozzi, V., M. Jacomelli, D. Catelan, M. Servili, A. Taticchi, A. Biggeri, P. Dolara and L. Giovannelli (2012). "Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress." Rejuvenation Res **15**(6): 601-612.

Podloucká, P., K. Berka, G. Fabre, M. Paloncýová, J.-L. Duroux, M. Otyepka and P. Trouillas (2013). "Lipid Bilayer Membrane Affinity Rationalizes Inhibition of Lipid Peroxidation by a Natural Lignan Antioxidant." The Journal of Physical Chemistry B **117**(17): 5043-5049.

Poirier, J., J. Davignon, D. Bouthillier, S. Kogan, P. Bertrand and S. Gauthier (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease." Lancet **342**(8873): 697-699.

Pourkhodadad, S., M. Alirezaei, M. Moghaddasi, H. Ahmadvand, M. Karami, B. Delfan and Z. Khanipour (2016). "Neuroprotective effects of oleuropein against cognitive dysfunction induced by colchicine in hippocampal CA1 area in rats." The Journal of Physiological Sciences **66**(5): 397-405.

Pragasam, S. J., V. Venkatesan and M. Rasool (2013). "Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of p-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats." Inflammation **36**(1): 169-176.

Pratico, D. (2008). "Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows." Ann N Y Acad Sci **1147**: 70-78.

Prince, M., A. Wimo, M. Guerchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu and M. Prina (2015). World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London, Alzheimer's Disease International: 87.

Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." J Agric Food Chem **53**(10): 4290-4302.

Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, R. Djaldetti, G. Liberatore, M. Vila, S. Vukosavic and G. Almer (2000). "The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism." Restor Neurol Neurosci **16**(2): 135-142.

Psaltopoulou, T., A. Kyrozi, P. Stathopoulos, D. Trichopoulos, D. Vassilopoulos and A. Trichopoulou (2008). "Diet, physical activity and cognitive impairment among elders: the EPIC-Greece cohort (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)." Public Health Nutr **11**(10): 1054-1062.

Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus and L. Pouysegu (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." Angew Chem Int Ed Engl **50**(3): 586-621.

Quiles, J. L., J. J. Ochoa, C. Ramirez-Tortosa, M. Battino, J. R. Huertas, Y. Martín and J. Mataix (2004). "Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats." Experimental Gerontology **39**(8): 1189-1198.

Quirantes-Piné, R., M. Herranz-López, L. Funes, I. Borrás-Linares, V. Micol, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez (2013). "Phenylpropanoids and their metabolites are the major

compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats." Phytomedicine **20**(12): 1112-1118.

Quirantes-Piné, R., G. Zurek, E. Barrajón-Catalán, C. Bäßmann, V. Micol, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez (2013). "A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **72**: 121-126.

Ramassamy, C. (2006). "Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets." Eur J Pharmacol **545**(1): 51-64.

Ramassamy, C., D. Averill, U. Beffert, S. Bastianetto, L. Theroux, S. Lussier-Cacan, J. S. Cohn, Y. Christen, J. Davignon, R. Quirion and J. Poirier (1999). "Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 544-553.

Ramírez, E., M. Brenes, P. García, E. Medina and C. Romero (2016). "Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes." Food Chemistry **206**: 204-209.

Ramírez, E., B. Gandul-Rojas, C. Romero, M. Brenes and L. Gallardo-Guerrero (2015). "Composition of pigments and colour changes in green table olives related to processing type." Food Chemistry **166**: 115-124.

Ramos Bernardes da Silva Filho, S., J. H. Oliveira Barbosa, C. Rondinoni, A. C. Dos Santos, C. E. Garrido Salmon, N. K. da Costa Lima, E. Ferriolli and J. C. Moriguti (2017). "Neurodegeneration profile of Alzheimer's patients: A brain morphometry study." NeuroImage. Clinical **15**: 15-24.

Ramsey, C. P. and B. I. Giasson (2007). "Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: Implications for treatment." Drugs and Aging **24**(2): 95-105.

Rebrin, I. and R. S. Sohal (2008). "Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging." Advanced drug delivery reviews **60**(13-14): 1545-1552.

Rechner, A. R., G. Kuhnle, H. Hu, A. Roedig-Penman, M. H. van den Braak, K. P. Moore and C. A. Rice-Evans (2002). "The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites." Free Radic Res **36**(11): 1229-1241.

Remington, R., C. Bechtel, D. Larsen, A. Samar, R. Page, C. Morrell and T. B. Shea (2016). "Maintenance of Cognitive Performance and Mood for Individuals with Alzheimer's Disease Following Consumption of a Nutraceutical Formulation: A One-Year, Open-Label Study." J Alzheimers Dis **51**(4): 991-995.

Rendeiro, C., J. S. Rhodes and J. P. E. Spencer (2015). "The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects." Neurochemistry International **89**: 126-139.

Rene, A., M. L. Abasq, D. Hauchard and P. Hapiot (2010). "How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity." Anal Chem **82**(20): 8703-8710.

- Rice-Evans, A. C., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of Flavonoids and phenolic acids." Free Radic Biol Med **20**(7): 933-956.
- Richards, M. L. and W. Sadee (1986). "Human neuroblastoma cell lines as models of catechol uptake." Brain Research **384**(1): 132-137.
- Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger and M. B. Youdim (1989). "Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains." J Neurochem **52**(2): 515-520.
- Rietjens, S. J., A. Bast and G. R. Haenen (2007). "New insights into controversies on the antioxidant potential of the olive oil antioxidant hydroxytyrosol." J Agric Food Chem **55**(18): 7609-7614.
- Rigacci, S., V. Guidotti, M. Bucciantini, M. Parri, C. Nediani, E. Cerbai, M. Stefani and A. Berti (2010). "Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin." The Journal of Nutritional Biochemistry **21**(8): 726-735.
- Rinaldi, P., M. C. Polidori, A. Metastasio, E. Mariani, P. Mattioli, A. Cherubini, M. Catani, R. Cecchetti, U. Senin and P. Mecocci (2003). "Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(7): 915-919.
- Roche, M., C. Dufour, N. Mora and O. Dangles (2005). "Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry." Org. Biomol. Chem. **3**(3): 423-430.
- Rodriguez-Morato, J., A. Boronat, A. Kotronoulas, M. Pujadas, A. Pastor, E. Olesti, C. Perez-Mana, O. Khymenets, M. Fito, M. Farre and R. de la Torre (2016). "Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol." Drug Metab. Rev. **48**(2): 218-236.
- Rodriguez-Morato, J., P. Robledo, J. A. Tanner, A. Boronat, C. Perez-Mana, C. Y. Oliver Chen, R. F. Tyndale and R. de la Torre (2017). "CYP2D6 and CYP2A6 biotransform dietary tyrosol into hydroxytyrosol." Food Chem **217**: 716-725.
- Rodriguez-Morato, J., L. Xicota, M. Fito, M. Farre, M. Dierssen and R. de la Torre (2015). "Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases." Molecules **20**(3): 4655-4680.
- Rodríguez, G., A. Lama, M. Trujillo, J. L. Espartero and J. Fernández-Bolaños (2009). "Isolation of a powerful antioxidant from Olea europaea fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol." LWT - Food Science and Technology **42**(2): 483-490.
- Romero, C., M. Brenes, P. García and A. Garrido (2002). "Hydroxytyrosol 4-β-d-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(13): 3835-3839.
- Rossi, M., F. Caruso, L. Kwok, G. Lee, A. Caruso, F. Gionfra, E. Candelotti, S. L. Belli, N. Molasky, K. M. Raley-Susman, S. Leone, T. Filipisky, D. Tofani, J. Pedersen and S. Incerpi (2017). "Protection by extra virgin olive oil against oxidative stress in vitro and in vivo. Chemical and

biological studies on the health benefits due to a major component of the Mediterranean diet." PLoS One **12**(12): e0189341.

Sacks, F. M., L. P. Svetkey, W. M. Vollmer, L. J. Appel, G. A. Bray, D. Harsha, E. Obarzanek, P. R. Conlin, E. R. Miller, D. G. Simons-Morton, N. Karanja, P.-H. Lin, M. Aickin, M. M. Most-Windhauser, T. J. Moore, M. A. Proschan and J. A. Cutler (2001). "Effects on Blood Pressure of Reduced Dietary Sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet." New England Journal of Medicine **344**(1): 3-10.

Saija, A., D. Trombetta, A. Tomaino, R. Lo Cascio, P. Princi, N. Uccella, F. Bonina and F. Castelli (1998). "'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol." International Journal of Pharmaceutics **166**(2): 123-133.

Saija, A. and N. Uccella (2000). "Olive biophenols: functional effects on human wellbeing." Trends in Food Science & Technology **11**(9): 357-363.

Saija Antonella, Trombetta Domenico, Tomaino Antonio, Lo Cascio Rossella, Princi Pietro, Uccella Nicola, Bonina Francesco and C. Francesco. (1998). "In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol." International Journal of Pharmaceutics **166**: 123–133.

Salas-Salvadó, J., M. Bulló, N. Babio, M. Á. Martínez-González, N. Ibarrola-Jurado, J. Basora, R. Estruch, M. I. Covas, D. Corella, F. Arós, V. Ruiz-Gutiérrez and E. Ros (2011). "Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet." Diabetes Care **34**(1): 14.

Samieri, C., C. Feart, C. Proust-Lima, E. Peuchant, C. Tzourio, C. Stapf, C. Berr and P. Barberger-Gateau (2011). "Olive oil consumption, plasma oleic acid, and stroke incidence: the Three-City Study." Neurology **77**(5): 418-425.

Sangiovanni, E., E. Colombo, M. Fumagalli, F. Abbiati, D. Caruso and M. Dell'Agli (2012). "Inhibition of NF- κ B activity by minor polar components of extra-virgin olive oil at gastric level." Phytother Res **26**(10): 1569-1571.

Santos, D. P., M. F. Bergamini, A. G. Fogg and M. V. B. Zanoni (2005). "Application of a Glassy Carbon Electrode Modified with Poly(Glutamic Acid) in Caffeic Acid Determination." Microchimica Acta **151**(1-2): 127-134.

Sarbishegi, M., F. Mehraein and M. Soleimani (2014). "Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats." Iran Biomed J **18**(1): 16-22.

Satoh, T. and S. A. Lipton (2007). "Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds." Trends Neurosci **30**(1): 37-45.

Satoh, T., R. Stalder, S. R. McKercher, R. E. Williamson, G. P. Roth and S. A. Lipton (2015). "Nrf2 and HSF-1 Pathway Activation via Hydroquinone-Based Proelectrophilic Small Molecules is Regulated by Electrochemical Oxidation Potential." ASN Neuro **7**(4).

Scahill, R. I., J. M. Schott, J. M. Stevens, M. N. Rossor and N. C. Fox (2002). "Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(7): 4703-4707.

Scapagnini, G., S. Vasto, N. G. Abraham, C. Caruso, D. Zella and G. Fabio (2011). "Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders." Mol Neurobiol **44**(2): 192-201.

Scarmeas, N., J. A. Luchsinger, N. Schupf, A. M. Brickman, S. Cosentino, M. X. Tang and Y. Stern (2009). "Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease." JAMA **302**(6): 627-637.

Scarmeas, N., Y. Stern, R. Mayeux and J. A. Luchsinger (2006). "Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation." Arch Neurol **63**(12): 1709-1717.

Schaffer, S. and B. Halliwell (2012). "Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations." Genes & nutrition **7**(2): 99-109.

Schaffer, S., M. Podstawa, F. Visioli, P. Bogani, W. E. Muller and G. P. Eckert (2007). "Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo." J Agric Food Chem **55**(13): 5043-5049.

Schapira, A. H. (2010). "Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration." Exp Neurol **224**(2): 331-335.

Schapira, A. H. V., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner and C. D. Marsden (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." Journal of Neurochemistry **54**(3): 823-827.

Schroder, H., M. Fito, R. Estruch, M. A. Martinez-Gonzalez, D. Corella, J. Salas-Salvado, R. Lamuela-Raventos, E. Ros, I. Salaverria, M. Fiol, J. Lapetra, E. Vinyoles, E. Gomez-Gracia, C. Lahoz, L. Serra-Majem, X. Pinto, V. Ruiz-Gutierrez and M. I. Covas (2011). "A short screener is valid for assessing Mediterranean diet adherence among older Spanish men and women." J Nutr **141**(6): 1140-1145.

Selkoe, D. J., C. R. Abraham, M. B. Podlisny and L. K. Duffy (1986). "Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease." J Neurochem **46**(6): 1820-1834.

Selye, H. (1955). "Stress and Disease." Science **122**(3171): 625-631.

Seo, E.-J., N. Fischer and T. Efferth (2018). "Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease." Pharmacological Research **129**: 262-273.

Serra, A., L. Rubio, X. Borrás, A. Macia, M. P. Romero and M. J. Motilva (2012). "Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake." Mol Nutr Food Res **56**(3): 486-496.

Serra, G., M. Deiana, J. P. E. Spencer and G. Corona (2017). "Olive Oil Phenolics Prevent Oxysterol-Induced Proinflammatory Cytokine Secretion and Reactive Oxygen Species Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, Through Modulation of p38 and JNK Pathways." Molecular nutrition & food research **61**(12): 1700283.

Serrano-Pozo, A., J. Qian, A. Muzikansky, S. E. Monsell, T. J. Montine, M. P. Frosch, R. A. Betensky and B. T. Hyman (2016). "Thal Amyloid Stages Do Not Significantly Impact the Correlation Between Neuropathological Change and Cognition in the Alzheimer Disease Continuum." Journal of neuropathology and experimental neurology **75**(6): 516-526.

Serrelli, G. and M. Deiana (2018). "Biological Relevance of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Metabolites." Antioxidants **7**(12).

Servili, M. and G. Montedoro (2002). "Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality." European Journal of Lipid Science and Technology **104**(9-10): 602-613.

Shakersain, B., G. Santoni, S. C. Larsson, G. Faxén-Irving, J. Fastbom, L. Fratiglioni and W. Xu (2016). "Prudent diet may attenuate the adverse effects of Western diet on cognitive decline." Alzheimer's & Dementia **12**(2): 100-109.

Shamoto-Nagai, M., S. Hisaka, M. Naoi and W. Maruyama (2018). "Modification of α -synuclein by lipid peroxidation products derived from polyunsaturated fatty acids promotes toxic oligomerization: its relevance to Parkinson disease." Journal of clinical biochemistry and nutrition **62**(3): 207-212.

Shamoto-Nagai, M., W. Maruyama, Y. Hashizume, M. Yoshida, T. Osawa, P. Riederer and M. Naoi (2007). "In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity." J Neural Transm (Vienna) **114**(12): 1559-1567.

Shan, X. and C.-I. G. Lin (2006). "Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease." Neurobiology of Aging **27**(5): 657-662.

Sheng, B., X. Wang, B. Su, H.-g. Lee, G. Casadesus, G. Perry and X. Zhu (2012). "Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." Journal of neurochemistry **120**(3): 419-429.

Sheng, G.-Q., J.-R. Zhang, X.-P. Pu, J. Ma and C.-L. Li (2002). "Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells." European Journal of Pharmacology **451**(2): 119-124.

Shih, R. H., C. Y. Wang and C. M. Yang (2015). "NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review." Front Mol Neurosci **8**: 77.

Shinto, L., J. Quinn, T. Montine, H. H. Dodge, W. Woodward, S. Baldauf-Wagner, D. Waichunas, L. Bumgarner, D. Bourdette, L. Silbert and J. Kaye (2014). "A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's disease : JAD **38**(1): 111-120.

Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, S. Daniel, Y. Agid, F. Javoy-Agid, P. Jenner and C. D. Marsden (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-355.

Sies, H. (1985). 1 - Oxidative Stress: Introductory Remarks. Oxidative Stress. H. Sies. London, Academic Press: 1-8.

Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." Redox biology **4**: 180-183.

Singh, M., M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy and C. Ramassamy (2008). "Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms." J Agric Food Chem **56**(13): 4855-4873.

Singh, M., T. N. Dang, M. Arseneault and C. Ramassamy (2010). "Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein." J Alzheimers Dis **21**(3): 741-756.

Sivakumar, G., N. A. Uccella and L. Gentile (2018). "Probing Downstream Olive Biophenol Secoiridoids." Int J Mol Sci **19**(10).

Šmejkalová, D., A. Piccolo and M. Spiteller (2006). "Oligomerization of Humic Phenolic Monomers by Oxidative Coupling under Biomimetic Catalysis." Environmental Science & Technology **40**(22): 6955-6962.

Smith P. J., Blumenthal J. A., Babyak M. A., L. Craighead, Welsh-Bohmer K. A., Browndyke J. N., Strauman T. A. and A. Sherwood (2010). "Effects of the Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet, Exercise, and Caloric Restriction on Neurocognition in Overweight Adults With High Blood Pressure." Hypertension **55**(6): 1331-1338.

Société Alzheimer Canada. (2019). "Médicaments approuvés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer | Société Alzheimer du Canada." from <https://alzheimer.ca/fr/Home/About-dementia/Treatment-options/Drugs-approved-for-Alzheimers-disease>.

Sofi, F., F. Cesari, R. Abbate, G. F. Gensini and A. Casini (2008). "Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis." BMJ **337**: a1344.

Sofic, E., K. W. Lange, K. Jellinger and P. Riederer (1992). "Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease." Neurosci Lett **142**(2): 128-130.

Sofic, E., P. Riederer, H. Heinsen, H. Beckmann, G. P. Reynolds, G. Hebenstreit and M. B. Youdim (1988). "Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain." J Neural Transm **74**(3): 199-205.

Soler, A., M. P. Romero, A. Macià, S. Saha, C. S. M. Furniss, P. A. Kroon and M. J. Motilva (2010). "Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line." Food Chemistry **119**(2): 703-714.

Solfrizzi, V., A. M. Colacicco, A. D'Introno, C. Capurso, F. Torres, C. Rizzo, A. Capurso and F. Panza (2006). "Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging." Neurobiol Aging **27**(11): 1694-1704.

Solfrizzi, V., A. D'Introno, A. M. Colacicco, C. Capurso, A. Del Parigi, S. Capurso, A. Gadaleta, A. Capurso and F. Panza (2005). "Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia." Experimental Gerontology **40**(4): 257-270.

Song, Y. and G. R. Buettner (2010). "Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide." Free Radical Biology and Medicine **49**(6): 919-962.

Spillantini, M. (1998). "Filamentous alpha-synuclein ".

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, N. J. Cairns, P. L. Lantos and M. Goedert (1998). "Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Neurosci Lett **251**(3): 205-208.

Srinivasan, M. and D. K. Lahiri (2015). "Significance of NF-kappaB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis." Expert Opin Ther Targets **19**(4): 471-487.

St-Laurent-Thibault, C., M. Arseneault, F. Longpre and C. Ramassamy (2011). "Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling." Curr Alzheimer Res **8**(5): 543-551.

Stefania, R., G. Valentina, B. Monica, N. Daniela, R. Annalisa, B. Andrea and S. Massimo (2011). "Aβ(1-42) Aggregates into Non-Toxic Amyloid Assemblies in the Presence of the Natural Polyphenol Oleuropein Aglycon." Current Alzheimer Research **8**(8): 841-852.

Steffen, L. M. and D. R. Jacobs, Jr. (2003). "Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy." The American Journal of Clinical Nutrition **78**(3): 508S-513S.

Strittmatter, W. J., K. H. Weisgraber, D. Y. Huang, L. M. Dong, G. S. Salvesen, M. Pericak-Vance, D. Schmechel, A. M. Saunders, D. Goldgaber and A. D. Roses (1993). "Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8098-8102.

Studzinski, C. M., F. Li, A. J. Bruce-Keller, S. O. Fernandez-Kim, L. Zhang, A. M. Weidner, W. R. Markesbery, M. P. Murphy and J. N. Keller (2009). "Effects of short-term Western diet on cerebral oxidative stress and diabetes related factors in APP × PS1 knock-in mice." Journal of Neurochemistry **108**(4): 860-866.

Stupans, I., A. Kirlich, K. L. Tuck and P. J. Hayball (2002). "Comparison of Radical Scavenging Effect, Inhibition of Microsomal Oxygen Free Radical Generation, and Serum Lipoprotein Oxidation of Several Natural Antioxidants." J. Agric. Food Chem. **50**: 2464-2469.

Suarez, M., M. P. Romero, A. Macia, R. M. Valls, S. Fernandez, R. Sola and M. J. Motilva (2009). "Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **877**(32): 4097-4106.

Sultana, R. and D. A. Butterfield (2009). "Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment." Journal of bioenergetics and biomembranes **41**(5): 441-446.

Sultana, R. and D. A. Butterfield (2010). "Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **19**(1): 341-353.

Sun, W., X. Wang, C. Hou, L. Yang, H. Li, J. Guo, C. Huo, M. Wang, Y. Miao, J. Liu and Y. Kang (2017). "Oleuropein improves mitochondrial function to attenuate oxidative stress by activating the Nrf2 pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats." Neuropharmacology **113**(Pt A): 556-566.

Swaminathan, A. and G. A. Jicha (2014). "Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia." Frontiers in Aging Neuroscience **6**: 282.

Szwajgier, D., K. Borowiec and K. Pustelniak (2017). "The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action." Nutrients **9**(5): 477.

Tabart, J., C. Kevers, J. Pincemail, J.-O. Defraigne and J. Dommès (2009). "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests." Food Chemistry **113**(4): 1226-1233.

Tabner, B. J., O. M. El-Agnaf, S. Turnbull, M. J. German, K. E. Paleologou, Y. Hayashi, L. J. Cooper, N. J. Fullwood and D. Allsop (2005). "Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia." J Biol Chem **280**(43): 35789-35792.

Tak, P. P. and G. S. Firestein (2001). "NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.

Tan, J. B. L. and Y. Y. Lim (2015). "Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts." Food Chemistry **172**: 814-822.

Tomic, J. L., A. Pensalfini, E. Head and C. G. Glabe (2009). "Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction." Neurobiology of Disease **35**(3): 352-358.

Toth, G., C. Barabas, A. Toth, A. Kery, S. Beni, I. Boldizsar, E. Varga and B. Noszal (2016). "Characterization of antioxidant phenolics in *Syringa vulgaris* L. flowers and fruits by HPLC-DAD-ESI-MS." Biomed Chromatogr **30**(6): 923-932.

Trempe, J. F. and E. A. Fon (2013). "Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection." Front Neurol **4**: 38.

Trichopoulou, A., T. Costacou, C. Bamia and D. Trichopoulos (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." N Engl J Med **348**(26): 2599-2608.

Trujillo, M., E. Gallardo, A. Madrona, L. Bravo, B. Sarria, J. A. Gonzalez-Correa, R. Mateos and J. L. Espartero (2014). "Synthesis and antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol and its acyl derivatives." J Agric Food Chem **62**(42): 10297-10303.

Truong, V.-L., M. Jun and W.-S. Jeong (2017). "Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress." BioFactors **44**(1): 36-49.

Tuck, K. L., M. P. Freeman, P. J. Hayball, G. L. Stretch and I. Stupans (2001). "The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats." J Nutr **131**(7): 1993-1996.

Tuck, K. L., P. J. Hayball and I. Stupans (2002). "Structural Characterization of the Metabolites of Hydroxytyrosol, the Principal Phenolic Component in Olive Oil, in Rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(8): 2404-2409.

Tufekci, K. U., E. C. Bayin, S. Genc and K. Genc (2011). "The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." Parkinsons Disease.

Turner, R., N. Etienne, M. G. Alonso, S. de Pascual-Teresa, A. M. Minihane, P. D. Weinberg and G. Rimbach (2005). "Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics." Int J Vitam Nutr Res **75**(1): 61-70.

Tzika, E. D., V. Papadimitriou, T. G. Sotiroudou and A. Xenakis (2008). "Oxidation of oleuropein studied by EPR and spectrophotometry." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(2): 149-157.

Umeno, A., M. Takashima, K. Murotomi, Y. Nakajima, T. Koike, T. Matsuo and Y. Yoshida (2015). "Radical-scavenging Activity and Antioxidative Effects of Olive Leaf Components Oleuropein and Hydroxytyrosol in Comparison with Homovanillic Alcohol." J Oleo Sci **64**(7): 793-800.

Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger and N. W. Wood (2004). "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." Science **304**(5674): 1158-1160.

Vallabhapurapu, S. and M. Karin (2009). "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system." Annu Rev Immunol **27**: 693-733.

Valls-Pedret, C., R. M. Lamuela-Raventos, A. Medina-Reimon, M. Quintana, D. Corella, X. Pinto, M. A. Martinez-Gonzalez, R. Estruch and E. Ros (2012). "Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk." J Alzheimers Dis **29**(4): 773-782.

Valls-Pedret, C., A. Sala-Vila, M. Serra-Mir, D. Corella, R. de la Torre, M. A. Martinez-Gonzalez, E. H. Martinez-Lapiscina, M. Fito, A. Perez-Heras, J. Salas-Salvado, R. Estruch and E. Ros (2015). "Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial." JAMA Intern Med **175**(7): 1094-1103.

Van Acker, S. A. B. E., D.-j. Van Den Berg, M. N. J. L. Tromp, D. H. Griffioen, W. P. Van Bennekom, W. J. F. Van Der Vijgh and A. Bast (1996). "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids." Free Radical Biology and Medicine **20**(3): 331-342.

Van Der Heide, L. P., A. Kamal, A. Artola, W. H. Gispen and G. M. J. Ramakers (2005). "Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidyl-inositol-3-kinase-dependent manner." Journal of Neurochemistry **94**(4): 1158-1166.

Vauzour, D., G. Corona and J. P. Spencer (2010). "Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyldopamine induced neurotoxicity." Arch Biochem Biophys **501**(1): 106-111.

Villemagne, V. L., K. E. Pike, G. Chételat, K. A. Ellis, R. S. Mulligan, P. Bourgeat, U. Ackermann, G. Jones, C. Szoeke, O. Salvado, R. Martins, G. O'Keefe, C. A. Mathis, W. E. Klunk, D. Ames, C. L. Masters and C. C. Rowe (2011). "Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease." Annals of neurology **69**(1): 181-192.

Vinaixa, M., E. L. Schymanski, S. Neumann, M. Navarro, R. M. Salek and O. Yanes (2016). "Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects." TrAC Trends in Analytical Chemistry **78**: 23-35.

Visioli, F., D. Caruso, C. Galli, S. Viappiani, G. Galli and A. Sala (2000). "Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 797-799.

Visioli, F., D. Caruso, E. Plasmati, R. Patelli, N. Mulinacci, A. Romani, G. Galli and C. Galli (2001). "Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose- dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma." Free Radic Res **34**(3): 301-305.

Visioli, F. and C. Galli (1998). "The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings." Nutr Rev **56**(5 Pt 1): 142-147.

Visioli, F. and C. Galli (2001). "Phenolics from olive oil and its waste products. Biological activities in in vitro and in vivo studies." World Rev Nutr Diet **88**: 233-237.

Visioli, F., C. Galli, F. Bornet, A. Mattei, R. Patelli, G. Galli and D. Caruso (2000). "Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans." FEBS Lett **468**(2-3): 159-160.

Vissers, M. N., P. L. Zock and M. B. Katan (2004). "Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review." Eur J Clin Nutr **58**(6): 955-965.

Vissers, M. N., P. L. Zock, A. J. Roodenburg, R. Leenen and M. B. Katan (2002). "Olive oil phenols are absorbed in humans." J Nutr **132**(3): 409-417.

Vitale, R. M., L. Antenucci, M. Gavagnin, G. Raimo and P. Amodeo (2017). "Structure-activity relationships of fraxamoside as an unusual xanthine oxidase inhibitor." J Enzyme Inhib Med Chem **32**(1): 345-354.

Vogna, D., A. Pezzella, L. Panzella, A. Napolitano and M. d'Ischia (2003). "Oxidative chemistry of hydroxytyrosol: isolation and characterisation of novel methanooxocinobenzodioxinone derivatives." Tetrahedron Letters **44**(45): 8289-8292.

von Bernhardt, R. and J. Eugenin (2011). "Alzheimer's Disease: Redox Dysregulation As a Common Denominator for Diverse Pathogenic Mechanisms." Antioxidants & Redox Signaling **16**(9): 974-1031.

Vuolo, M. M., V. S. Lima and M. R. Maróstica Junior (2019). Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. Bioactive Compounds. M. R. S. Campos, Woodhead Publishing: 33-50.

Wang, J., W. R. Markesbery and M. A. Lovell (2006). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment." J Neurochem **96**(3): 825-832.

Wang, Q., W. X. Li, S. X. Dai, Y. C. Guo, F. F. Han, J. J. Zheng, G. H. Li and J. F. Huang (2017). "Meta-Analysis of Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease Revealed Commonly Impaired Pathways and Dysregulation of NRF2-Dependent Genes." J Alzheimers Dis **56**(4): 1525-1539.

Wang, X., B. Thomas, R. Sachdeva, L. Arterburn, L. Frye, P. G. Hatcher, D. G. Cornwell and J. Ma (2006). "Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and

induction of endoplasmic reticulum stress." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(10): 3604-3609.

Wang, X. J., J. D. Hayes, L. G. Higgins, C. R. Wolf and A. T. Dinkova-Kostova (2010). "Activation of the NRF2 signaling pathway by copper-mediated redox cycling of para- and ortho-hydroquinones." Chem Biol **17**(1): 75-85.

Wardyn, J. D., A. H. Ponsford and C. M. Sanderson (2015). "Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-kappaB response pathways." Biochem Soc Trans **43**(4): 621-626.

Wilcock, G. K., M. M. Esiri, D. M. Bowen and C. C. T. Smith (1982). "Alzheimer's disease: Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities." Journal of the Neurological Sciences **57**(2): 407-417.

Willett, W. (1998). Nutritional epidemiology. New York, Oxford University Press.

Willett, W. C., F. Sacks, A. Trichopoulou, G. Drescher, A. Ferro-Luzzi, E. Helsing and D. Trichopoulos (1995). "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating." Am J Clin Nutr **61**(6 Suppl): 1402S-1406S.

Williamson, E. M. (2001). "Synergy and other interactions in phytochemicals." Phytochemistry **8**(5): 401-409.

Wilms, H., P. Rosenstiel, J. Sievers, G. Deuschl, L. Zecca and R. Lucius (2003). "Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease." FASEB J **17**(3): 500-502.

Winterbourn, C. C. (2013). "The biological chemistry of hydrogen peroxide." Methods Enzymol **528**: 3-25.

Witte, A. V., L. Kerti, D. S. Margulies and A. Flöel (2014). "Effects of Resveratrol on Memory Performance, Hippocampal Functional Connectivity, and Glucose Metabolism in Healthy Older Adults." The Journal of Neuroscience **34**(23): 7862.

Wray, S. and P. Lewis (2010). "A Tangled Web – Tau and Sporadic Parkinson's Disease." Frontiers in Psychiatry **1**(150).

Wright, J. S., E. R. Johnson and G. A. DiLabio (2001). "Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants." Journal of the American Chemical Society **123**(6): 1173-1183.

Yadav, T. C., N. Kumar, U. Raj, N. Goel, P. K. Vardawaj, R. Prasad and V. Pruthi (2019). "Exploration of interaction mechanism of tyrosol as a potent anti-inflammatory agent." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics: 1-16.

Yang, Y., S. Jiang, J. Yan, Y. Li, Z. Xin, Y. Lin and Y. Qu (2015). "An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders." Cytokine Growth Factor Rev **26**(1): 47-57.

Yatin, S. M., S. Varadarajan, C. D. Link and D. A. Butterfield (1999). "In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42)." Neurobiology of Aging **20**(3): 325-330.

- Yoon, J. H., K. Youn, C. T. Ho, M. V. Karwe, W. S. Jeong and M. Jun (2014). "p-Coumaric acid and ursolic acid from Corni fructus attenuated beta-amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF-kappaB signaling pathway in PC12 cells." J Agric Food Chem **62**(21): 4911-4916.
- Yoritaka, A., N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E. R. Stadtman and Y. Mizuno (1996). "Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(7): 2696-2701.
- Youdim, K. A., M. S. Dobbie, G. Kuhnle, A. R. Proteggente, N. J. Abbott and C. Rice-Evans (2003). "Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies." J Neurochem **85**.
- Youdim, K. A., M. Z. Qaiser, D. J. Begley, C. A. Rice-Evans and N. J. Abbott (2004). "Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier." Free Radic Biol Med **36**.
- Yuan, J. J., C. Z. Wang, J. Z. Ye, R. Tao and Y. S. Zhang (2015). "Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (olive) leaf extract and antioxidant activities." Molecules **20**(2): 2903-2921.
- Yubero-Serrano, E. M., J. Lopez-Moreno, F. Gomez-Delgado and J. Lopez-Miranda (2018). "Extra virgin olive oil: More than a healthy fat." European Journal of Clinical Nutrition.
- Zafiridis, E., N. Benetti, J. Liang, N. P. Bonvino, T. C. Karagiannis, A. Hung, E. D. McCord, N. B. Ray and D. Boskou (2018). "OliveNet™: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*." Database **2018**.
- Zafra-Gómez, A., B. Luzón-Toro, S. Capel-Cuevas and J. C. Morales (2011). "Stability of Hydroxytyrosol in Aqueous Solutions at Different Concentration, Temperature and with Different Ionic Content: A Study Using UPLC-MS." Food and Nutrition Sciences **02**(10): 1114-1120.
- Zhang, D., C. Wang, L. Shen, H.-C. Shin, K. B. Lee and B. Ji (2018). "Comparative analysis of oxidative mechanisms of phloroglucinol and dieckol by electrochemical, spectroscopic, cellular and computational methods." RSC Advances **8**(4): 1963-1972.
- Zhang, L., B. Zhao, D. T. Yew, J. W. Kusiak and G. S. Roth (1997). "Processing of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein during H₂O₂-Induced Apoptosis in Human Neuronal Cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **235**(3): 845-848.
- Zhao, M., D. Zhu, D. Sun-Waterhouse, G. Su, L. Lin, X. Wang and Y. Dong (2014). "In vitro and in vivo studies on adlay-derived seed extracts: phenolic profiles, antioxidant activities, serum uric acid suppression, and xanthine oxidase inhibitory effects." J Agric Food Chem **62**(31): 7771-7778.
- Zhao, Z. and M. H. Moghadasian (2009). "Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies." Phytochemistry Reviews **9**(1): 133-145.
- Zhu, C. W., H. Grossman, J. Neugroschl, S. Parker, A. Burden, X. Luo and M. Sano (2018). "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol with glucose and malate (RGM) to slow the progression of Alzheimer's disease: A pilot study." Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.) **4**: 609-616.