HAL
open science

Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium

Joris Vidé

To cite this version:

Joris Vidé. Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium. Alimentation et Nutrition. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTS082 . tel-01629826

HAL Id: tel-01629826

https://theses.hal.science/tel-01629826

Submitted on 6 Nov 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par

UNIVERSITE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences des Procédés, Sciences des Aliments (SP-SA)**

Et de l'unité de recherche : **UMR 204 NUTRIPASS - Prévention des Malnutritions et des Pathologies Associées**

Spécialité : **Nutrition / Santé**

Présentée par **JORIS VIDÉ**

Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydant et anti-inflammatoire d'un apport nutritionnel de spirulines enrichies en silicium.

Soutenue le 22 mai 2015 devant le jury composé de

M. Cyril AUGER, CR, CNRS - UMR 7213	Rapporteur
M. Charles COUDRAY, CR, INRA - UMR 866	Rapporteur
Mme Cinta BLADÉ, Pr, Université de Tarragone	Examinateur
M. Jean-Paul CRISTOL, Pr, Université Montpellier	Examinateur
M. Gérard CROS, Pr, CNRS - UMR 5247	Examinateur
M. Olivier DANGLES, Pr, Université d'Avignon	Examinateur
Mme Sylvie GAILLET, MCF, Université Montpellier	Co-encadrante de thèse
M. Jean-Max ROUANET, MCF, Université Montpellier	Directeur de thèse

« La vie ce n’est pas d’attendre que l’orage passe, c’est d’apprendre comment danser sous la pluie. »

Sénèque

Remerciements

Mes premiers remerciements sont évidemment adressés à mon directeur de thèse, Monsieur Jean-Max Rouanet. Je lui suis sincèrement reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son équipe dès mon stage de Master 2 et de m'avoir donné l'opportunité de continuer avec une thèse. Merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années. Son encadrement scientifique, sa disponibilité, sa patience et sa convivialité ont grandement contribué au bon déroulement de ce travail. Les séances d'œnologie me manqueront…Je vous souhaite le meilleur pour votre nouvelle vie.

Un immense merci à ma co-directrice, Sylvie Gaillet. Les mots ne suffiront pas à la remercier pour toute l'aide qu'elle m'a apportée durant ces années, autant dans mon travail que dans la vie quotidienne. Sa disponibilité, sa générosité, son enthousiasme ont été une source d'énergie pour moi au cours de cette thèse.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Messieurs Cyril Auger et Charles Coudray de me faire le privilège de lire et de juger ce travail.

Merci à Messieurs les Professeurs Jean-Paul Cristol et Olivier Dangles de me faire l'honneur d'assister à ma soutenance et d'avoir bien voulu suivre le déroulement de ma thèse.

Merci également à Madame le Professeur Cinta Bladé et Monsieur le Professeur Gérard Cros de me faire le privilège d'être membres de ce jury de thèse.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à l'entreprise Phyco-Biotech pour m'avoir permis de réaliser ce projet. Je remercie particulièrement Monsieur Gilbert Gay pour son soutien inestimable durant ces années. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné l'opportunité d'accomplir ce travail et d'avoir consenti à m'intégrer au sein de l'entreprise.
Mes remerciements vont également à Nicolas Jouy et Jean-Claude Baccou pour leur disponibilité, leur sympathie et leur confiance au cours de ces années.
Un grand merci aux personnes de la production pour leur apport essentiel au cours de cette thèse, car sans eux ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux personnes de l'UM2, présentes et passées. Un grand merci à Nathalie Rugani de m'avoir donné l'opportunité de faire mes premiers pas dans la recherche, bien que la culture cellulaire ne fut pas « ma tasse de thé », pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa bonne humeur. Je remercie également Marie France Bézine pour sa bonne humeur matinale avant les séances de gavage et de sacrifice. Merci à toute l'équipe du CECEMA pour m'avoir facilité l'accès à l'animalerie et leur aide.

Merci également à toute l'équipe établie à l'IURC, notamment Marion Morena et Eric Badia pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, pour m'avoir facilité l'accès au matériel analytique mais aussi pour leur disponibilité et leur sympathie. Merci également à Céline pour sa gentillesse et son aide.

Je tiens à exprimer un grand merci à l'équipe U1046, Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles, et plus particulièrement à Anne Virsolvy et Sylvain

Richard. Merci pour leur accueil, leur enthousiasme et leur sympathie lors de mon passage. Merci à eux pour l'intérêt porté à mon travail et le temps consacré à m'initier à la dysfonction artérielle.

Que l'équipe du laboratoire DMEM - UMR866, Endocrinologie Mitochondriale et Nutrition reçoive mes plus sincères remerciements pour son enthousiasme, sa sympathie et sa disponibilité lors de mon passage chez elle. Un grand merci à Christine Feillet-Coudray pour l'intérêt porté à cette thèse. Mes remerciements sont également adressés à Béatrice Bonafos et Gilles Fouret pour leur bonne humeur et leur aide précieuse durant ces longues journées de manip.

Merci au Professeur Jeanne Ramos et son équipe du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique de Gui de Chauliac pour le temps qu'ils ont consacré à m'initier aux techniques d'histologie hépatique.

Un grand merci aux stagiaires qui sont passés au labo, principalement Jérémy et Lucie. Votre aide et votre sympathie ont été les bienvenues.

Merci également à ma belle-famille, surtout à ma belle-mère Hélène pour le temps consacré à la relecture de ce manuscrit.

Je remercie également tous mes amis ayant participé de près ou de loin à cette thèse. Un immense merci à « ma compagne de route » durant toutes ces années au labo, Cindy Romain. Bien plus qu'une collègue de thèse, c'est une véritable amie que j'ai trouvée. Merci pour toutes nos discussions autour d'un café (d'ailleurs la fac doit être en faillite depuis que tu es partie !!!), nos galères de gavage et de manip. Merci tout simplement pour ton soutien dans les bons et les mauvais moments. Ces années passées au labo n'auraient pas eu la même saveur sans toi « tête-plate ». J'espère que nos chemins professionnels se recroiseront un jour.

A tous les membres de la BAB (Flo, Mat C., Tony, Anna, Marion, Elo & Mat D., petit Louis & petit Paul), un immense merci pour ce que vous êtes et ce que vous m'apportez. Bien plus que des amis, vous êtes ma deuxième famille. Merci tout simplement pour tous ces moments de bonheur passés ensemble. Une chance de vous avoir à mes côtés depuis toutes ces années. BAB Forever !!!

Un grand merci à mon frère de cœur, Yan, et à sa petite famille. Toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments depuis plus de 25 ans. Après m'avoir fait découvrir le marathon, j'ai hâte de relever de nouveaux défis sportifs à tes côtés.

A Laure, ma moitié, sans qui rien de tout ça n'aurait pu voir le jour. Merci d'être ce que tu es, merci de croire en moi, merci pour ton soutien infaillible. C'est une chance pour moi de t'avoir dans ma vie. Cependant, un simple merci ne suffirait pas à t'exprimer tout ce que je ressens. Une nouvelle aventure s'ouvre à nous mais avant let's go to the USA baby !!!!

Mes derniers remerciements sont évidemment adressés à toute ma famille sans qui cela n'aurait été possible. Merci à eux d'être aussi extraordinaires et d'être toujours là les uns pour les autres. Une pensée à tous les anges qui veillent sur moi et qui j'espère sont fiers. Un immense merci à ma sœur, ma deuxième maman : ta force de caractère et ton courage sont

un exemple pour moi. Evidemment merci à mes parents sans qui ce manuscrit ne serait pas. Merci pour votre soutien sans faille, votre confiance et pour m'avoir poussé tout au long de mes études et de ma vie. C'est une immense fierté d'avoir des parents comme vous. Merci d'avoir fait de moi la personne que je suis. Merci pour tout.

« C'est justement la possibilité de réaliser un rêve qui rend la vie intéressante. »
Paulo Coelho

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Publications :

ROMAIN C., GAILLET S., CARILLON J., **VIDÉ J.**, RAMOS J., IZARD J.-C., CRISTOL J.-P., ROUANET J.-M.
Vineatrol and cardiovascular disease : beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(44), 11029-36 ; **2012**.

EBABE ELLE R., GAILLET S., **VIDÉ J.**, ROMAIN C., LAURET C., RUGANI N., CRISTOL J.-P., ROUANET J.-M.
Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats : effects on oxidative stress and inflammation.
Food and Chemical Toxicology, 60, 297-301 ; **2013**.

ROMAIN C., BRESCIANI L., FEILLET-COUDRAY C., CALANI L., FOURET G., **VIDÉ J.**, RUGANI N., RAMOS J., DEL RIO D., CRISTOL J.-P., ROUANET J.-M.
Moderate chronic administration of Vineatrol-enriched red wines improves metabolic, oxidative and inflammatory markers in hamsters fed a high-fat diet.
Molecular Nutrition & Food Research, 58(6), 1212-25 ; **2014**.

VIDÉ J., ROMAIN C., FEILLET-COUDRAY C., BONAFOS B., CRISTOL J.-P., FOURET G., ROUANET J.-M.*, GAILLET S.*
(* these authors contributed equally to this work).
Assessment of potential toxicological aspects of dietary exposure to silicon-rich spirulina in rats.
Food and Chemical Toxicology, article accepté, **2015**.

VIDÉ J., VIRSOLVY A., ROMAIN C., RAMOS J., JOUY N., RICHARD S., CRISTOL J.-P., GAILLET S.*, ROUANET J.-M.*
(* these authors contributed equally to this work).
Dietary silicon-rich spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high fat diet.
Nutrition, article soumis puis révisé, **2015**.

Communication à des congrès :

MAN H., BIANGA J., **VIDÉ J.**, GAILLET S., RUGANI N., MOUNICOU S., ROUANET J.-M., SZPUNAR J.
Imagerie par Ablation Laser –ICP MS de l'argent dans le foie et le rein de rats exposés à des nanoparticules d'argent.
Spectr'Atom 2012, 19-22 juin **2012**, Pau, France.

ROMAIN C., GAILLET S., CARILLON J., **VIDÉ J.**, RAMOS J., IZARD J.-C., CRISTOL J.-P., ROUANET J.-M.
Vineatrol® and cardiovascular disease : beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model.
2nd International Conference of Resveratrol and Health (Resveratrol 2012), 5-7 décembre **2012**, Leicester, Grande-Bretagne.

ROMAIN C., GAILLET S., CARILLON J., **VIDÉ J.**, RAMOS J., IZARD J.-C., CRISTOL J.-P., ROUANET J.-M.
Vineatrol® and cardiovascular disease : beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model.
81st European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2013), 2-5 juin **2013**, Lyon, France.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : *LES 10 PRINCIPALES CAUSES DE DECES DANS LE MONDE EN 2012* 2

TABLEAU 2 : *PRINCIPALES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE* 12

TABLEAU 3 : *DISTRIBUTION TISSULAIRE DES DIFFERENTES ISOFORMES DE LA NADPH OXYDASE* 18

TABLEAU 4 : *CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES HUMAINES* .. 22

TABLEAU 5 : *CRITERES ET SEUILS DE DIAGNOSTIC DU SYNDROME METABOLIQUE* 49

TABLEAU 6 : *TAXONOMIE DE L'ESPECE SPIRULINA PLATENSIS* 63

TABLEAU 7 : *COMPOSITION EN ACIDES AMINES ESSENTIELS DE LA SPIRULINE* 67

TABLEAU 8 : *COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA SPIRULINE* 68

TABLEAU 9 : *COMPOSITION EN VITAMINES DE LA SPIRULINE* 70

TABLEAU 10 : *COMPOSITION EN MINERAUX ET OLIGOELEMENTS DE LA SPIRULINE* 72

TABLEAU 11 : *COMPOSITION EN PIGMENTS DE LA SPIRULINE* 73

TABLEAU 12 : *COMPOSITION DU CALCIUM-SPIRULAN* 79

TABLEAU 13 : *SOURCES ALIMENTAIRES DE SILICIUM* 84

TABLEAU 14 : *COMPOSITION DU MILIEU ZAROUK* 97

TABLEAU 15 : *COMPOSITION DES REGIMES* 99

TABLEAU 16 : *COMPOSITION DU REGIME HF1* 122

TABLEAU 17 : *PARAMETRES LIPIDIQUES PLASMATIQUES* 122

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : *STRUCTURE DE LA PAROI ARTERIELLE* 5

FIGURE 2 : *CLASSIFICATION DES LESIONS D'ATHEROSCLEROSE* 8

FIGURE 3 : *EVOLUTION DE LA PLAQUE D'ATHEROME ET CONSEQUENCES PHYSIOPATHOLOGIQUES* 9

FIGURE 4 : *FACTEURS INITIATEURS DU STRESS OXYDANT* 11

FIGURE 5 : *FORMATION EN CASCADE DES DIFFERENTES ESPECES OXYGENEES REACTIVES A PARTIR DU RADICAL SUPEROXYDE* 13

FIGURE 6 : PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE PAR LA CHAINE DE TRANSPORT D'ELECTRONS DE LA MITOCHONDRIE 15

FIGURE 7 : *LES DIFFERENTES ISOFORMES DE LA NADPH OXYDASE* 16

FIGURE 8 : *REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTIVATION DE LA NADPH OXYDASE* 17

FIGURE 9 : *DECOUPLAGE DES eNOS A L'ORIGINE DE LA PRODUCTION DES PEROXYNITRITES* 19

FIGURE 10 : *STRUCTURE GENERALE D'UNE LIPOPROTEINE* 21

FIGURE 11 : *VOIE METABOLIQUE EXOGENE DES LIPOPROTEINES* 24

FIGURE 12 : *VOIE METABOLIQUE ENDOGENE DES LIPOPROTEINES* 25

FIGURE 13 : *VOIE METABOLIQUE DE FORMATION DES HDL ET TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL* ... 26

FIGURE 14 : *EFFET DES SUBSTANCES VASODILATATRICES LIBEREES PAR L'ENDOTHELIUM* 29

FIGURE 15 : *INITIATION DE LA LESION ATHEROMATEUSE* 32

FIGURE 16 : *REACTION INFLAMMATOIRE AU COURS DE L'ATHEROGENESE* 35

FIGURE 17 : *FORMATION DES CELLULES SPUMEUSES* 37

FIGURE 18 : *FORMATION DU CORPS NECROTIQUE ET DE LA CHAPE FIBREUSE* 39

FIGURE 19 : *EVOLUTION DE LESION (FORMATION D'UN THROMBUS)* 41

FIGURE 20 : *DEVELOPPEMENT ET HISTOLOGIE DE LA NAFLD* 50

FIGURE 21 : *BOUCLE D'AMPLIFICATION ENTRE LE STRESS OXYDANT ET L'INFLAMMATION* 52

Figure 22 : *Proprietes fonctionnelles athero-protectrices des HDL* 54

Figure 23 : *Role athero-protecteur des HDL* 55

Figure 24 : *Principaux systemes oxydants et antioxydants endogenes*..... 57

Figure 25 : *Morphologie de la spiruline*..... 64

Figure 26 : *Composition de la spiruline en pourcentage de son poids sec* 66

Figure 27 : *Structure d'un phycobilisome.* 76

Figure 28 : *Structure chimique de la phycocyanobiline, biliverdine et bilirubine* 78

Figure 29 : *Production d'anion superoxyde hepatique*..... 123

Figure 30 : *Coupes histologiques de foie*..... 123

Figure 31 : *Micrographies de sections de la surface de la crosse aortique coloree a l'huile O*

..... 124

Figure 32 : *Aire des depots lipidiques aortiques.* 124

Liste des Abréviations

12/15-LO	: 12/15-Lipoxygénase
4-AAP	: 4-aminoantipyrine
5-LO	: 5-Lipoxygénase
ABC	: ATP Binding Cassette Transporter
AC	: Adényl Cyclase
ACAT-1	: Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase-1
ACh	: Acétylcholine
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADP	: Adénosine Diphosphate
AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AgII	: Angiotensine II
AGEs	: Produits de Glycation Avancée
AGL	: Acides Gras Libres
AGMI	: Acides Gras Monoinsaturés
AGPI	: Acides Gras Polyinsaturés
AGS	: Acides Gras Saturés
AHA	: American Heart Association
Akt	: Protéine kinase B
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
Apo(a)	: Apolipoprotéine (a)
ApoA1	: Apolipoprotéine A1
$ApoB_{48}$	: Apolipoprotéine B_{48}
$ApoB_{100}$	: Apolipoprotéine B_{100}
ApoCII	: Apolipoprotéine CII
ApoE	: Apolipoprotéine E
ARE	: Antioxydant Response Element
ATP	: Adénosine Triphosphate
BH_3	: Borane
BH_4	: Tétrahydrobioptérine
CAOP	: Capacité Antioxydante du Plasma
CAT	: Catalase
CE	: Cholestérol Estérase
CETP	: Cholesteryl Ester Transfer Protein
$CH_3Si(OH)_3$	: Monométhyl-silanetriol
CML	: Cellules Musculaires Lisses
CO	: Cholestérol Oxydase
COX	: Cyclo-Oxygénase
CuZn-SOD	: SOD à Cuivre-Zinc
DAG	: Diacylglycérol
DAP	: Dihydroxy-acétone Phosphate
DGDG	: Digalactosyldiacylglycérol
DHBS	: 3,5-dichloro-2-hydrobenzène
DPI	: Diphényliodonium
DTNB	: acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
DTPA	: Acide acétique diéthylentriaminepenta
DUAL	: Dual oxydase

EC-SOD	: SOD extracellulaire
EDHF	: Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium
EFSA	: Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
eNOS	: NO Synthase endothéliale
ET-1	: Endothéline-1
$FADH_2$	: Flavine Adénine Dinucléotide
GC	: Guanylate Cyclase
GDP	: Guanosine Diphosphate
GK	: Glycérol Kinase
GMPc	: Guanosine Monophosphate cyclique
GPO	: Glycérol-3-Phosphate-Oxydase
GPx	: Glutathion Peroxydase
GR	: Glutathion Réductase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
GTP	: Guanosine Triphosphate
H^+	: Proton
H_2O	: Molécule d'eau
H_2O_2	: Peroxyde d'Hydrogène
HBA	: Acide Hydrobenzoïque
HDL	: High Density Lipoprotein
HDL-C	: Cholestérol-HDL
HF	: High Fat
HO°	: Radical Hydroxyl
HOCl	: Acide Hypochloreux
HOMA-IR	: Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance
HTA	: Hypertension Artérielle
ICAM-1	: Intracellular Adhesion Molecule-1
IDL	: Intermediate Density Lipoprotein
IFN-γ	: Interféron gamma
IL-6	: Interleukine-6
IL-8	: Interleukine-8
IMC	: Indice de Masse Corporelle
iNOS	: NO Synthase inductible
INT	: 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phényltétrazolium chloride
IP-3	: Inositol Triphosphate
IR	: Insulino-Résistance
KO	: Knock-Out
LCAT	: Lécithine-Cholestérol-Acyltransférase
LDL	: Low Density Lipoprotein
LDL-C	: Cholestérol-LDL
LDLmm	: LDL modérément modifiées
LDLox	: LDL oxydées
LEE	: Limitante Elastique Externe
LEI	: Limitante Elastique Interne
LFA-1	: Lymphocyte Function Associated Antigen-1
LH	: Lipase Hépatique
LO	: Lipoxygénase
LOX-1	: Lectin like oxLDL Receptor
Lp(a)	: Lipoprotéine (a)

LPL	: Lipoprotéine Lipase
MAPK	: Mitrogen Activated Protein Kinase
M-CSF	: Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCV	: Maladies Cardiovasculaires
MDA	: Malondialdéhyde
MEC	: Matrice Extracellulaire
MGDG	: Monogalactosyldiacylglycérol
MMP	: Métalloprotéinase
Mn-SOD	: SOD à Manganèse
MPO	: Myéloperoxydase
MRFIT	: Multiple Risk Factor Intervention Trial
NADH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH oxydase	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase
NAFLD	: Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	: Non Alcoholic Steato-Hepatitis
NCEP-ATPIII	: National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III
NF-κB	: Nuclear Factor kappa B
NIH	: National Institutes of Health
nNOS	: NO Synthase neuronale
NO	: Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NOS	: NO Synthase
NOX	: NADPH oxydase
Nrf2	: Nuclear factor erythroid-2 related factor 2
O_2	: Dioxygène
$O_2°^-$	: Anion superoxyde
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
$ONOO^-$	: Peroxynitrite
PAF-AH	: Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PE	: Phényléphrine
PGI_2	: Prostacycline
PKG	: Protéine Kinase G
PLC	: Phospholipase C
PON-1	: Paraoxonase-1
PSS	: Solution Saline Physiologique
R-LDL	: Récepteur aux LDL
RLU	: Relative Lights Units
RNS	: Espèces Réactives à l'Azote
ROO°	: Radical Peroxyl
ROS	: Espèces Réactives à l'Oxygène
SAFE	: Scientific Animal Food & Engineering
SIDA	: Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
Si	: Silicium
$Si(OH)_4$	: Acide Orthosilicique
SiO_2	: Silice
SiRNA	: Small interfering RNA
SGDG	: Sulfoquinovosyldiacylglycérol
SNP	: Sodium Nitroprusside

SOD	: Superoxyde Dismutase
SR-AI/II	: Type A Scavenger Receptor I/II
SRB1	: Scavenger Receptor Class B1
t-BHP	: Hydroperoxyde de ter-butyle
TBA	: Acide Thiobarbiturique
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Species
TG	: Triglycérides
TGFβ	: Transfering Growth Factor β
Th1	: Lymphocyte T Helper 1
TLR	: Toll Like Recpetor
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor alpha
TNB	: Acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)
Trég	: Lymphocyte T régulateur
TxA2	: Thromboxane A2
VCAM1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4	: Very Late Antigen-4
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
XO	: Xanthine Oxydase

Préambule

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont en constante augmentation au niveau mondial, ce qui fait d'elles un problème de santé publique. L'accroissement de ces pathologies est dû à un déséquilibre énergétique caractérisé par une augmentation de la consommation d'aliments à forte valeur énergétique et une diminution de l'activité physique. Ce problème concerne autant les pays industrialisés que les pays en voie de développement.
Dans ce contexte, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fait de la nutrition une priorité en santé publique. En 2004, elle a adopté une stratégie mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé, visant notamment à réduire les facteurs de risque des maladies non transmissibles et également à promouvoir la recherche sur l'alimentation.

Les travaux sur la pathogenèse des MCV réalisés ces dernières années, ont mis en évidence de nombreuses composantes influençant le développement de ces pathologies : notamment l'obésité, la dysfonction endothéliale, le stress oxydant, l'inflammation, la dyslipidémie ou encore la résistance à l'insuline.
L'athérosclérose est un processus pathologique à l'origine des MCV, caractérisée par une accumulation lipidique dans la paroi artérielle, entrainant *in fine* l'obstruction de l'artère et une ischémie.
La modulation nutritionnelle des facteurs de risque de l'athérosclérose et des perturbations associées, pourrait prévenir le développement de la pathologie. La prévention de ces désordres est donc la cible des entreprises pharmaceutiques et agroalimentaires.

Bien que le silicium soit un des éléments les plus abondants sur Terre (deuxième après l'oxygène), il n'a reçu que très peu d'intérêt dans le domaine de la biologie. En effet, de par sa forme minérale retrouvée à l'état naturel, dans les aliments et les eaux de boisson, le silicium présente une faible biodisponibilité pour l'organisme humain. Malgré cela, quelques travaux ont mis en évidence un réel intérêt du silicium chez l'homme. En effet, il semble jouer un rôle important dans les MCV et plus particulièrement dans l'athérosclérose, puisque des travaux ont montré que la teneur en silicium dans l'organisme est inversement proportionnelle au développement de la pathologie. De plus, la teneur en silicium diminue au cours du vieillissement, rendant ainsi l'organisme sensible aux MCV. Produire une forme de silicium hautement disponible pour l'homme représente donc une option intéressante dans la prévention de la pathologie cardiovasculaire.
La spiruline, microalgue consommée depuis des milliers d'années, pourrait être un excellent moyen d'y parvenir puisqu'elle possède la capacité d'incorporer dans son organisme des

éléments afin de les rendre hautement disponibles pour l'homme. De plus, elle possède des qualités nutritionnelles remarquables et présente également des effets bénéfiques sur certaines pathologies, comme l'athérosclérose.

Le but de mon travail est d'étudier les effets de la spiruline enrichie en silicium sur la prévention de l'athérosclérose et de mettre en évidence des hypothèses de mécanismes d'action.
Dans un premier temps, il a donc été important de déterminer si ce nouveau complément alimentaire, la spiruline enrichie en silicium, possède une éventuelle toxicité. Les résultats obtenus nous ont conduit, dans un second temps, à rechercher les effets bénéfiques contingents de cette microalgue sur la pathologie athéromateuse puis à étudier si l'enrichissement en silicium potentialise ces effets par rapport à la spiruline brute.

Ce manuscrit de thèse se divise en plusieurs parties. Dans un premier chapitre, seront présentées les données bibliographiques concernant l'athérosclérose, son développement et ses facteurs de risque. La spiruline, sa composition, ses propriétés et ses effets bénéfiques sur diverses pathologies seront traités dans un deuxième volet de l'introduction bibliographique. Le troisième volet sera consacré au silicium, dans le domaine biologique.
Dans un second chapitre, les résultats expérimentaux seront présentés comme suit :

- Evaluation d'une possible toxicité chronique chez le rat Sprague-Dawley.
- Mise au point du modèle animal d'athérosclérose.
- Effet d'un apport alimentaire de spiruline enrichie en silicium chez le hamster Syrien doré athéromateux.

Pour finir, une discussion et des perspectives de travail seront abordées dans la dernière partie du manuscrit.

SOMMAIRE

Introduction Bibliographique 1

Partie I - Athérosclérose et Maladies Cardiovasculaires 2

A Généralités 2

B Anatomopathologie de l'athérosclérose 3

B.1 Morphologie de l'artère saine 4

B.1.1 Intima 4

B.1.2 Media 4

B.1.3 Adventice 4

B.2 Composition cellulaire de l'artère 5

B.2.1 Cellules endothéliales 5

B.2.2 Cellules musculaires lisses (CML) 5

B.2.3 Fibroblastes 6

B.3 Matrice extracellulaire (MEC) 6

B.3.1 Collagène 6

B.3.2 Elastine 6

B.3.3 Protéoglycanes 7

B.3.4 Glycoprotéines de structure 7

B.4 Physiopathologie de l'athérosclérose 7

C Composantes de l'athérogenèse 9

C.1 Stress oxydant 10

C.1.1 Définition 10

C.1.2 Espèces pro-oxydantes 11

C.1.3 Sources biologiques des ROS 13

C.1.3.1 Mitochondrie 14

C.1.3.2 NADPH oxydase 15

C.1.3.3 NO synthase 18

C.1.3.4 Autres sources de ROS 19

C.1.4 Le stress oxydant et les dégâts cellulaires 20

C.2 Rôle des lipoprotéines 21
C.3 Dysfonction endothéliale 26
D Mécanismes de l'athérogenèse 30
D.1 Initiation de la lésion 30
D.2 Progression de la lésion 32
D.2.1 Réaction inflammatoire 33
D.2.2 Formation des cellules spumeuses 35
D.3 Complications de la lésion 37
D.4 Evolution de la lésion 39
E Facteurs de risque et protection des maladies cardiovasculaires 42
E.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires 42
E.1.1 Facteurs de risque non modifiables 42
E.1.2 Facteurs de risque modifiables 43
E.1.2.1 Dyslipidémie 43
E.1.2.2 Hypertension artérielle 43
E.1.2.3 Tabagisme 44
E.1.2.4 Régime alimentaire 44
E.1.2.5 Diabète 45
E.1.2.6 Obésité et pathologies associées 46
E.1.2.6.1 Obésité 46
E.1.2.6.2 Syndrome Métabolique 48
E.1.2.6.3 Foie stéatosé non alcoolique 49
E.2 Protection des maladies cardiovasculaires 53
E.2.1 Rôle athéro-protecteur des HDL 53
E.2.2 Mécanismes antioxydants : Défenses enzymatiques 55
E.2.2.1 Superoxyde Dismutase 56
E.2.2.2 Catalase 56
E.2.2.3 Glutathion peroxydase 56
E.2.3 Mécanismes antioxydants : défenses non enzymatiques 57
E.2.3.1 Vitamine E 57
E.2.3.2 Vitamine C 58
E.2.3.3 Acide urique 58

E.2.3.4 Bilirubine 58
E.2.3.5 Groupements thiols 59
Partie II - Arthrospira platensis, une cyanobactérie 60
A Généralités 60
A.1 Cyanobactérie 60
A.2 Spiruline 61
A.2.1 Histoire 61
A.2.2 Taxonomie 63
A.2.3 Morphologie 63
A.2.4 Répartition géographique 64
A.2.5 Intérêts 64
B Composition spiruline 66
B.1 Protéines 66
B.2 Lipides 67
B.2.1 Acides gras 67
B.2.2 Lipides insaponifiables 68
B.3 Glucides 69
B.4 Acides Nucléiques 69
B.5 Vitamines 70
B.6 Minéraux et Oligoéléments 71
B.7 Pigments 72
B.8 Enzymes 73
C Activités thérapeutiques de la spiruline 74
C.1 Activité spécifique de la spiruline 74
C.1.1 Hypolipidémie 74
C.1.2 Stress Oxydant 74
C.1.3 Inflammation 75
C.1.4 Toxicité 75
C.2 Constituants fonctionnels principaux 75
C.2.1 Phycocyanine 76
C.2.1.1 Phycobilisome 76
C.2.1.2 Phycobiliprotéines 77

C.2.1.3 Propriétés de la phycocyanine 77
C.2.2 Calcium-spirulan 78
Partie III - Silicium 80
A Généralités 80
B Différentes formes de silicium 81
B.1 Silicium minéral à l'état solide 81
B.2 Silicium minéral à l'état liquide 81
B.3 Silicium organique 81
C Besoins et apports 82
D Absorption et biodisponibilité 84
E Localisation dans l'organisme 86
F Rôle du silicium dans l'organisme 86
F.1 Relation silicium et os 87
F.2 Relation silicium et MCV 88
F.3 Relation silicium et Alzheimer 89
F.4 Relation silicium et système immunitaire 90
F.5 Relation silicium, peau et cheveux 91
Objectifs de l'étude 92
Matériel & Méthodes 95
A Spiruline enrichie en silicium 96
B Modèle animal 97
B.1 Choix du modèle 97
B.2 Traitement et suivi 98
B.2.1 Régime utilisé 98
B.2.2 Gavage des animaux 100
C Prélèvement du sang et des tissus 101
D Paramètres biochimiques sanguins 102
D.1 Cholestérol plasmatique total 102
D.2 Cholestérol plasmatique lié aux HDL 103

D.3 Triglycérides plasmatiques 103
D.4 Activité de la paraoxonase plasmatique 104
D.5 Glucose plasmatique 105
D.6 Insuline plasmatique 106

E Paramètres oxydatifs 107
E.1 Activité de la NADPH oxydase cardiaque et hépatique 107
E.1.1 Préparation des fractions cytosoliques 107
E.1.2 Quantification des protéines 107
E.1.3 Chimioluminescence 107
E.2 Activité des TBARS 108
E.2.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques 109
E.2.2 Mesure de l'activité des TBARS hépatiques 109
E.3 Activité des enzymes antioxydantes hépatiques 109
E.3.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques 109
E.3.2 Mesure de l'activité de la superoxyde dismustase (SOD) 110
E.3.3 Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) 111
E.3.4 Mesure de l'activité de la catalase (CAT) 112
E.3.5 Mesure de l'activité des groupements thiols (SH) 112

F Paramètres inflammatoires 113
F.1 Concentration plasmatique en MCP-1 113
F.2 Concentration hépatique en TNF-α et IL-6 113
F.2.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques 113
F.2.2 Mesure de la production en TNF-α et IL-6 hépatiques 114
F.3 Activité hépatique du NF-κB 114
F.3.1 Préparation des fractions nucléaires hépatiques 114
F.3.2 Mesure de l'activité du NF-κB hépatique 115

G Réactivité vasculaire 115
G.1 Préparation des échantillons et montage 115
G.2 Détermination de la contractilité de l'artère 115

H Histologie hépatique 116

I Analyses statistiques 116

Résultats expérimentaux 118

A Etude 1 : Evaluation d'une potentielle toxicité chronique de la spiruline enrichie en silicium chez le rat Sprague-Dawley 119

A.1 But de l'étude 1 119

A.2 Article 1 119

A.3 Conclusion de l'étude 1 120

B Etude mise au point du modèle animal d'athérosclérose 121

B.1 But de l'étude mise au point 121

B.1.1 Paramètres lipidiques 122

B.1.2 Paramètres oxydatifs : activité de la NADPH oxydase hépatique 123

B.1.3 Histologie : stéatose hépatique 123

B.1.4 Quantification des dépôts lipidiques aortiques : 124

B.2 Conclusion de l'étude mise au point 125

C Etude 2 : Effets préventifs de la spiruline enrichie en silicium sur le modèle hamster Syrien doré athéromateux 127

C.1 But de l'étude 2 127

C.2 Article 2 128

C.3 Conclusion de l'étude 2 129

D Brevet d'application 130

Conclusion & Perspectives 131

Références Bibliographiques 138

Introduction Bibliographique

Partie I - Athérosclérose et Maladies Cardiovasculaires

A Généralités

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont des pathologies qui affectent le système circulatoire (cœur et vaisseaux sanguins) et qui sont un facteur de risque de mortalité important pour la population générale. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2012, les MCV, qui appartiennent aux maladies non transmissibles, sont la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 17,3 millions de décès imputables aux MCV, soit 30 % de la mortalité mondiale totale **(Tableau 1)**.

Tableau 1 : *Les 10 principales causes de décès dans le monde en 2012 (source OMS)*

Causes de décès	Estimées en Millions	Estimées en pourcentage
Cardiopathies ischémiques	*7,4*	*13,2*
Accidents vasculaires cérébraux	*6,7*	*11,9*
Broncho-pneumopathie obstructive chronique	*3,1*	*5,6*
Infections des voies respiratoires inférieures	*3,1*	*5,5*
Cancer du poumon, de la trachée et des bronches	*1,6*	*2,9*
VIH / SIDA	*1,5*	*2,7*
Diarrhée	*1,5*	*2,7*
Diabète sucré	*1,5*	*2,7*
Accidents de la route	*1,3*	*2,2*
Cardiopathie hypertensive	*1,1*	*2*

L'accumulation des principaux facteurs de risque des MCV tels que la sédentarité, une mauvaise hygiène alimentaire, le tabac, l'alcool, les facteurs métaboliques et les maladies

associées (diabète, hypertension, obésité), accélère considérablement le développement de ces maladies. Ces facteurs de risque comportementaux sont responsables d'environ 80 % des MCV.

L'athérosclérose est un processus pathologique impliqué dans la très grande majorité de ces MCV, et son évolution est donc un paramètre important du risque de mortalité globale.

L'OMS définit l'athérosclérose comme « une association variable de remaniements de l'*intima* des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout s'accompagnant de modifications de la *media* ». En fait, l'athérosclérose accélère le vieillissement des artères qui aboutit à la formation de plaques, composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol (athérome) enveloppés dans une chape fibreuse (sclérose) (Lusis, 2000).
Les conséquences de l'athérosclérose sont multiples et se manifestent à différents niveaux. Chez l'homme, les vaisseaux les plus touchés sont l'aorte, les artères coronaires, les artères carotides et les artères des membres inférieurs. La formation de la plaque d'athérome est responsable de diverses complications selon la localisation :

- Cardiopathies ischémiques (infarctus du myocarde)
- Accidents vasculaires cérébraux
- Artérites des membres inférieurs
- Ischémies aiguës des membres inférieurs
- Artères mésentériques (infarctus mésentérique)

B Anatomopathologie de l'athérosclérose

Les artères sont des vaisseaux flexibles qui transportent et distribuent le sang du cœur vers les organes et tissus périphériques. Le collagène et l'élastine sont les deux principales protéines constituantes des artères (Jacob, 2003). Toutes les artères de l'organisme reposent sur une organisation structurelle commune, bien qu'il existe des particularités en fonction du calibre. En effet, elles sont toutes constituées de trois tuniques concentriques successives qui sont, de la lumière du vaisseau vers l'extérieur : l'*intima*, la *media* et l'adventice **(Figure 1)**.

B.1 Morphologie de l'artère saine

B.1.1 Intima

L'*intima* est la tunique la plus interne et la plus fine et c'est à ce niveau que se développe l'athérosclérose. Elle sert de support à l'endothélium. Cet endothélium est composé d'une monocouche de cellules endothéliales, liées entre-elles par des jonctions serrées, ce qui en fait une barrière sélectivement perméable. Ce tissu conjonctif sous-endothélial est un ensemble complexe contenant des fibres de collagène, des fibres élastiques et des fibroblastes. L'*intima* est séparée de la *media* par une lame de fibre élastique : la limitante élastique interne (LEI).

B.1.2 Media

La *media* est la tunique centrale de l'artère. C'est aussi la plus épaisse. Son diamètre dépend de l'artère considérée. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses (CML), organisées en couches concentriques, appelées unités lamellaires, reposant sur des fibres conjonctives, dont le nombre augmente avec le calibre de l'artère. Ces CML sont entourées d'une matrice extracellulaire (MEC) composée de collagène et d'élastine. La *media* est responsable des fonctions vasomotrices, de la contention du sang et de l'amortissement de la variation de pression. La *media* est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe (LEE), une lame d'élastine.

B.1.3 Adventice

L'adventice, tunique la plus externe, est composée d'un tissu conjonctif très riche en collagène et en élastine, où l'on retrouve également des fibroblastes. Elle est parcourue de fibres musculaires lisses longitudinales et est irriguée par des micro-vaisseaux, les *vasa vasorum*. Ces vaisseaux transportent également le sang vers la partie externe de la *media*, assurant un rôle d'entretien. On retrouve aussi un réseau de nerfs vasomoteurs qui se projettent sur les CML de la *media*.

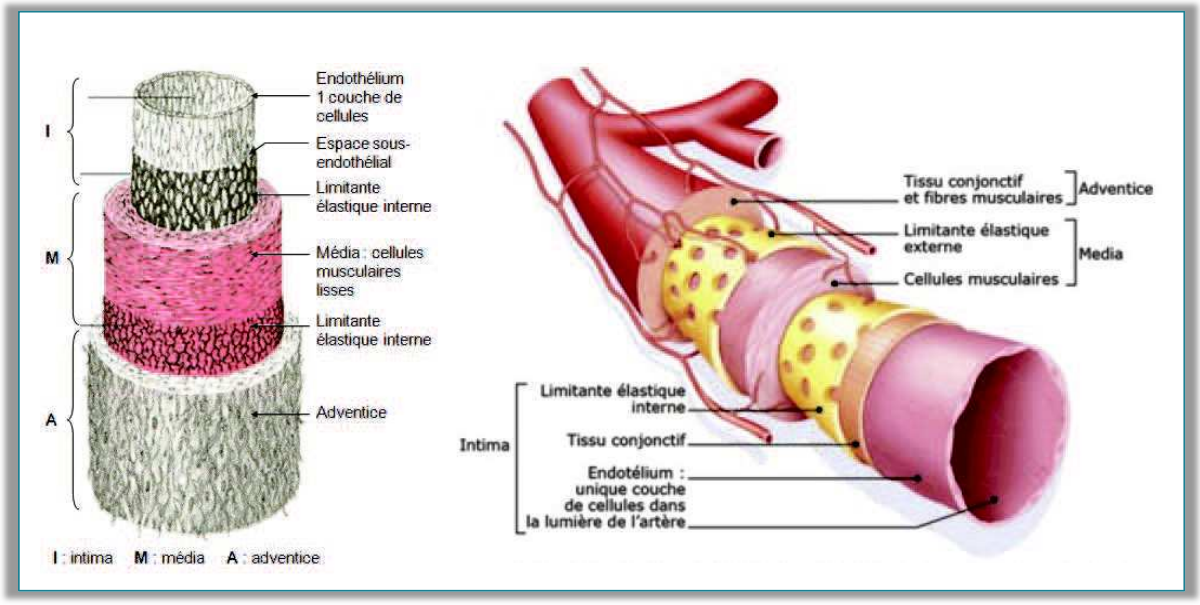


Figure 1 : *Structure de la paroi artérielle (www.sanofi.fr)*

B.2 Composition cellulaire de l'artère

B.2.1 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment une monocouche qui tapisse la lumière des artères. Elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques, telles que la régulation du tonus vasculaire, l'hémostase, la perméabilité endothéliale, la prolifération des CML et la réponse immunitaire (Braquet et al., 1994; Beagehold, 1998). De plus, elles produisent des facteurs anticoagulants et anti-thrombotiques.

B.2.2 Cellules musculaires lisses (CML)

Les CML sont multifactorielles. Elles contrôlent le tonus artériel (équilibre vasoconstriction / vasorelaxation). Ce sont les principales cellules qui élaborent la MEC de la *media* et de l'*intima* (Schwartz et al., 1995). Les CML participent également à la stabilisation et à l'adaptation de la paroi artérielle en réponse aux contraintes et aux lésions mécaniques, par hypertrophie et par hyperplasie.

B.2.3 Fibroblastes

Les fibroblastes sont majoritairement localisés au niveau de l'adventice de l'artère. Leur rôle principal est la synthèse des éléments de la MEC et notamment le collagène et l'élastine.

B.3 Matrice extracellulaire (MEC)

La MEC assure aux tissus leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques, fournit un échafaudage pour l'ancrage et la migration de cellules et agit sur la différenciation cellulaire. La MEC est composée de plusieurs éléments assurant chacun des fonctions spécifiques.

B.3.1 Collagène

Le rôle du collagène est d'assurer la résistance mécanique. On retrouve différents types de collagène au sein de l'artère avec des propriétés spécifiques pour chacun d'eux. Les collagènes de type I et III, qui sont de structure fibrillaire, représentent la majorité des types de collagène au sein de l'artère (Prockop and Kivirikko, 1995). Ils sont synthétisés par les fibroblastes et les CML. Le collagène de type I, le plus abondant, assure le support structural de l'artère, tandis que celui de type III est impliqué dans l'élasticité de la paroi. Le collagène de type IV est spécifique des membranes basales soutenant les cellules endothéliales et entourant les CML. Enfin, le collagène de type V, localisé autour des CML et près des membranes basales, régule la migration, la croissance et la différenciation cellulaire (Robins and Farquharson, 1995).

B.3.2 Elastine

L'élastine est une protéine fibreuse, formée essentiellement d'acides aminés hydrophobes. Elle est synthétisée par les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Cette protéine représente la composante majoritaire des fibres élastiques (environ 90 %), jouant un rôle primordial dans l'élasticité et l'extensibilité de la paroi artérielle (Debelle and Tamburro, 1999). La teneur en élastine dans les vaisseaux sanguins est directement proportionnelle aux forces de pression exercées sur ces vaisseaux. En effet, les artères proches du cœur sont riches

en élastine, alors que les vaisseaux soumis à des pressions plus faibles sont riches en collagène (Robins and Farquharson, 1995).

B.3.3 Protéoglycanes

Les protéoglycanes contrôlent l'hydratation, l'équilibre hydroélectrique ainsi que la perméabilité tissulaire. Leur localisation à l'interface membrane plasmique / MEC leur permet de contrôler la structure des tissus et d'influencer de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance, la différenciation, l'adhésion et la migration (Praillet et al., 1998). De plus, grâce à leur double nature chimique, protéique et osidique (Jackson et al., 1991; Kjellén and Lindahl, 1991), elles ont une aptitude à former des complexes avec différentes molécules. En effet, elles peuvent s'associer avec d'autres composants matriciels tels que les collagènes (Schönherr et al., 1995). Elles ont également la possibilité de fixer certaines cytokines et régler leur activité (Nathan and Sporn, 1991). Enfin, les protéoglycanes ont la capacité d'interagir et de moduler l'activité de certaines enzymes (Praillet et al., 1998).

B.3.4 Glycoprotéines de structure

Elles sont caractérisées par une grande insolubilité et leur rôle est d'assurer la cohésion entre les membranes cellulaires et la MEC.

B.4 Physiopathologie de l'athérosclérose

En 1994, une classification évolutive des lésions d'athérosclérose à partir de l'étude histologique d'artères coronaires humaines à été proposée par H.C. Stary (Stary et al., 1994, 1995), qui a été ensuite approuvée et adoptée par l'American Heart Association (AHA). Ces auteurs ont proposé de diviser la genèse de la plaque d'athérome en huit stades successifs **(Figure 2)**.

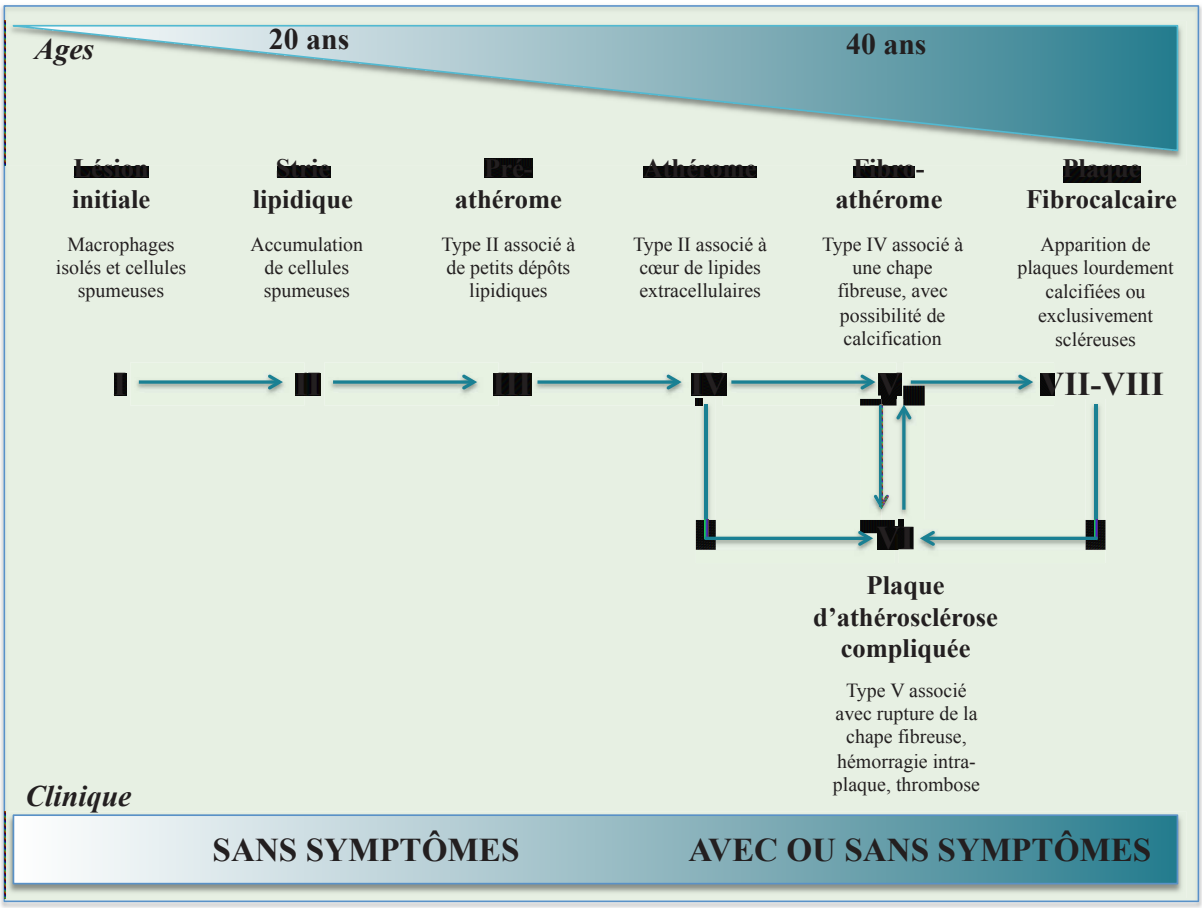


Figure 2 : *Classification des lésions d'athérosclérose* (Stary et al., 1995)

Le stade I se caractérise par la présence, au niveau de l'*intima*, de cellules spumeuses isolées, c'est-à-dire des macrophages contenant dans leur cytoplasme des lipides en grande quantité.

Les stries lipidiques, correspondant au stade II, se caractérisent par une accumulation de cellules spumeuses d'origine macrophagique mais aussi de CML. Ces cellules spumeuses forment de petits amas qui font légèrement saillie dans la lumière artérielle.

Ces deux premiers stades peuvent apparaître avant l'âge de 10 ans et sont asymptomatiques. Les stries lipidiques ont la capacité de régresser ou d'évoluer vers les stades suivants, III et IV, qui correspondent à la progression de la lésion d'athérosclérose. Le stade III, pré-athérome, généralement présent chez le jeune adulte, correspond au stade II associé à une accumulation abondante de dépôts lipidiques extracellulaires. Le stade IV, athérome, se caractérise par le regroupement des lipides extracellulaires et des cellules spumeuses en un amas appelé noyau lipidique formant l'athérome. Le stade suivant, le stade V, correspond à la plaque d'athérosclérose mature. Une chape fibreuse entoure le noyau lipidique, l'isolant de la lumière artérielle. Ce tissu fibreux est produit par les CML et est constitué de collagène, de mucopolysaccharides, d'élastine et de fibrine. L'évolution vers le stade VI, la plaque

d'athérome compliquée, qui reste longtemps asymptomatique, survient généralement après 40 ans suite à une thrombose, une hémorragie intra-plaque ou une rupture de la chape fibreuse **(Figure 3)**. A des âges plus avancés de la vie, on peut observer l'apparition des plaques lourdement calcifiées (stade VII) ou presque exclusivement scléreuses (stade VIII). Celles-ci sont en mesure d'être considérées comme des évolutions terminales de la plaque. Néanmoins, ces formes avancées peuvent probablement se compliquer davantage ou revenir au stade VI (Duriez, 2004). La gravité des lésions dépend beaucoup de leur localisation, de leur précocité et de leur vitesse d'évolution.

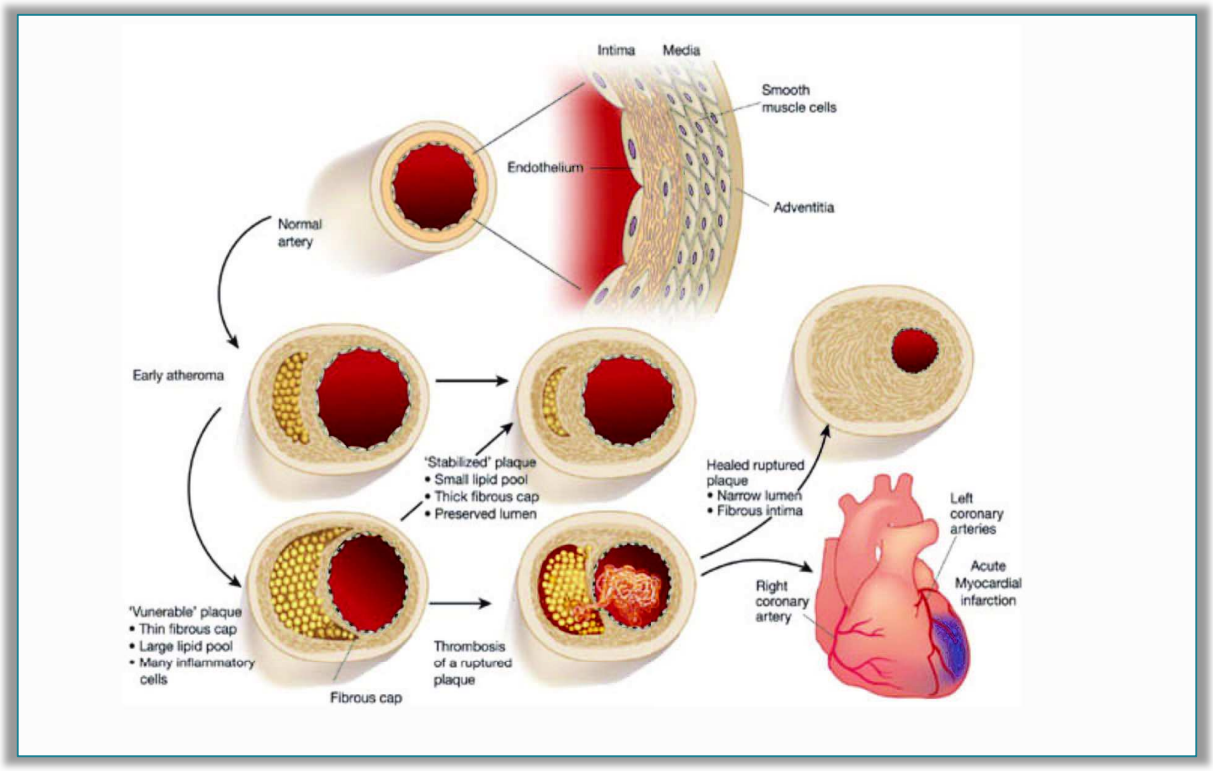


Figure 3 : *Evolution de la plaque d'athérome et conséquences physiopathologiques (Libby, 2002)*

C Composantes de l'athérogenèse

Historiquement, plusieurs théories se sont succédé, voire opposées sur les mécanismes de l'athérogenèse.

Il y a une trentaine d'années, la théorie de l'athérosclérose reposait essentiellement sur le rôle des lipides, dus à la forte corrélation entre l'hypercholestérolémie et l'apparition des plaques

(Ross and Harker, 1976). Au cours de ces vingt dernières années, une meilleure connaissance des cellules immunitaires a laissé la place, au fur et à mesure, à une théorie inflammatoire de l'athérogenèse (Luscinskas et al., 1991).
A l'heure actuelle, grâce à des études plus récentes, on peut maintenant affirmer que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses et moyennes artères, au niveau de l'*intima* (Ross, 1999; Shi et al., 2000). De plus, les LDL (Low Density Lipoprotein) modifiées, par une oxydation, sont les agents principaux à l'origine de la réaction inflammatoire (Lusis, 2000).

Les quatre composantes principales de l'athérogenèse - dysfonction endothéliale, hyperlipidémie, stress oxydant et inflammation - sont induites et potentialisées par de multiples facteurs de risque de l'athérosclérose. Celles-ci sont continuellement en interaction les unes avec les autres et participent à toutes les étapes de la formation de la lésion athéromateuse.

Avant d'aborder la chronologie des différentes étapes intervenant au cours de l'athérogenèse, un rappel succinct du stress oxydant, du métabolisme des lipoprotéines et du concept de dysfonction endothéliale fera l'objet de la partie suivante. Les composantes inflammatoires seront traitées dans la chapitre D.

C.1 Stress oxydant

C.1.1 Définition

Le stress oxydant est actuellement défini comme un déséquilibre de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants. Ce déséquilibre est dû à une surproduction d'espèces pro-oxydantes (Picchi et al., 2006), ou à un déficit en antioxydants, ou les deux à la fois, conduisant à une perturbation du contrôle et de la signalisation redox des cellules et/ou à des dommages moléculaires (Sies and Jones, 2007). Des facteurs pro-oxydants environnementaux, tels que le tabac, l'alcool, la pollution ou la prise de médicaments peuvent être à l'origine de l'apparition d'un stress oxydant (Valko et al., 2005, 2006) **(Figure 4)**.

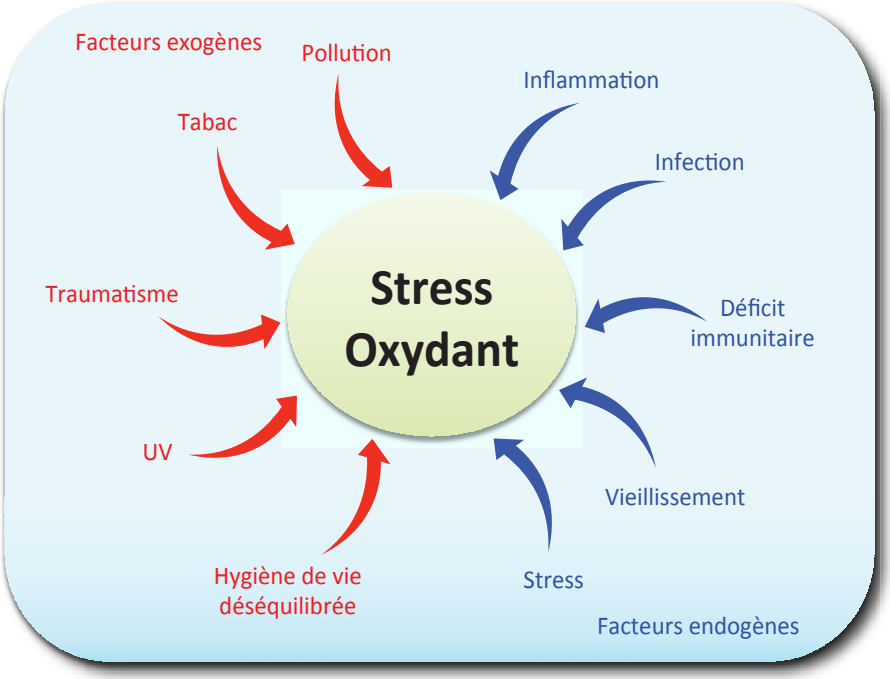


Figure 4 : *Facteurs initiateurs du stress oxydant*

Le stress oxydant est une composante largement impliquée dans le processus du vieillissement (El Assar et al., 2013; Simm and Campisi, 2014) mais également dans la pathogenèse de nombreuses maladies comme les maladies inflammatoires (Rezaie et al., 2007; Feijóo et al., 2010), les maladies neurologiques (Kalita et al., 2014; Wang et al., 2014), les cancers (Sosa et al., 2013; Gupta et al., 2014). Un stress oxydant a été observé au cours des MCV (Stocker and Keaney, 2004; Li et al., 2014), et plus particulièrement dans les nombreuses étapes de l'athérogenèse, notamment dans le processus d'initiation de la pathologie (Kaneto et al., 2010; Sugamura and Keaney, 2011).

C.1.2 Espèces pro-oxydantes

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe. De manière générale, les radicaux libres sont très réactifs et instables (Gilbert, 2000). En effet, ils cherchent à apparier leur électron célibataire en réagissant avec des molécules de leur environnement, provoquant des dommages cellulaires en chaine.

Ces espèces radicalaires sont bien connues pour jouer un double rôle. Elles peuvent avoir des effets soit nuisible, soit bénéfique, sur les systèmes vivants (Valko et al., 2006). A faible concentration, ces radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses fonctions

physiologiques, comme la phagocytose ou la régulation de la croissance et des signaux cellulaires (Ignarro, 2002; Martinon, 2010; Barbieri and Sestili, 2012). Cependant, lorsqu'ils sont en quantité trop importante, ils peuvent devenir cytotoxiques pour les cellules et entrainer l'oxydation des protéines (Davies, 1995; Refsgaard et al., 2000), des lipides membranaires (Dalle-Donne et al., 2006; Spiteller, 2007) et/ou de l'ADN (Dalle-Donne et al., 2006; Loft et al., 2008).

Dans les systèmes biologiques, les radicaux libres les plus importants proviennent des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et des espèces réactives à l'azote (RNS) **(Tableau 2)**.

Tableau 2 : *Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote*

(Rigas and Sun, 2008)

Espèces Réactives de l'oxygène (ROS)		Espèces Réactives de l'azote (RNS)	
Radicaux libres	Formes Non Radicalaires	Radicaux Libres	Formes Non Radicalaires
Anion superoxyde **$O_2^{\circ-}$**	Peroxyde d'hydrogène **H_2O_2**	Oxyde nitrique **NO°**	Acide nitrique **HNO_2**
Hydroxyl **HO°**	Acide hypochlorique **HOCl**	Dioxyde de nitrogène **NO_2°**	Peroxynitrite **$ONOO^-$**
Peroxyl **ROO°**	Peroxynitrite **$ONOO^-$**		Alkyl peroxynitrite **ROONO**
Alkoxyl **RO°**	Oxygène singulet **$^1O_2$**		Anion nytroxyl **NO^-**
Hydroperoxyl **HOO°**	Ozone **O_3**		

L'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est la forme primaire des ROS, et provient de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). Cet anion superoxyde peut ensuite être converti en ROS secondaires **(Figure 5)** tels que le radical hydroxyl (HO°), le radical peroxyl (ROO°) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier n'est pas un radical libre, puisqu'il ne possède pas d'électron célibataire, mais se révèle être un puissant oxydant.

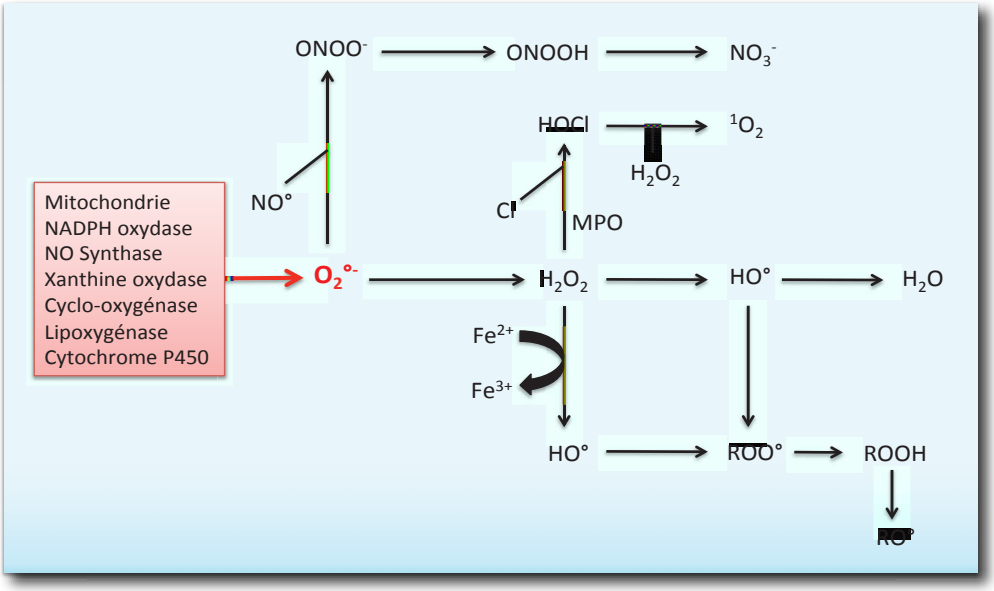


Figure 5 : *Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde*

(Koechlin-Ramonatxo, 2006)

Une augmentation de la présence des ROS et/ou des RNS, est le résultat d'une augmentation de leur production et/ou d'une diminution des systèmes protecteurs antioxydants chargés de les stabiliser.

C.1.3 Sources biologiques des ROS

Les ROS, et particulièrement l'$O_2^{\circ-}$, le principal précurseur, peuvent provenir soit de sources exogènes (rayons X, UV, etc.), soit de sources endogènes. Parmi ces dernières, on retrouve la mitochondrie (chaine de transport des électrons), et différentes enzymes comme la NADPH oxydase (NOX), la xanthine oxydase (XO), les NO synthases (NOS), la cyclo-oxygénase (COX) et les lipoxygénases (LO), ainsi que les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) (Cai and Harrison, 2000; Wassmann et al., 2004).

L'importance des ROS varie selon le tissu étudié et également selon les conditions, physiologiques ou pathologiques. Cependant le complexe enzymatique mitochondrial de la chaine respiratoire et les NOX représentent les sources principales de ROS.

C.1.3.1 Mitochondrie

La génération de ROS mitochondriales se déroule principalement au niveau de la chaine de transport d'électrons située sur la membrane interne de la mitochondrie au cours du processus de la phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative est un processus cellulaire essentiel qui utilise l'oxygène et l'énergie libérée par l'oxydation des nutriments afin de produire l'ATP (Adénosine Triphosphate), principale source d'énergie de la cellule.

La NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et la $FADH_2$ (Flavine Adénine Dinucléotide) cèdent leurs électrons aux complexes I et II respectivement. Les électrons de ces deux complexes sont transportés par le coenzyme Q (Ubiquinone) jusqu'au complexe III. Ils seront ensuite pris en charge par le cytochrome C qui libère les électrons au niveau du complexe IV. Ainsi, ils permettent la réduction de l'O_2 en H_2O. L'énergie libérée au cours de ce transfert d'électrons sur la chaine d'oxydoréduction engendre l'expulsion de protons (H^+) de la matrice vers l'espace inter-membranaire, au niveau des complexes I, III et IV. On se retrouve donc en présence d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne. Ce gradient électrochimique permet le retour des protons au sein de la matrice grâce au complexe V, l'ATP synthase lui permettant de générer de l'ATP à partir de la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Diphosphate).

Ce transfert d'électrons mitochondriaux n'est pas parfait car 1 à 2 % de l'oxygène échappent à la réduction complète en molécule d'eau pour former l'$O_2^{\circ-}$ (Hamanaka and Chandel, 2010). Il y a plusieurs sites connus dans la mitochondrie, qui ont la capacité de produire de l'$O_2^{\circ-}$ (Brand, 2010). De nombreuses études ont mis en évidence trois sites de fuites d'$O_2^{\circ-}$ majeures (Handy and Loscalzo, 2012; Li et al., 2013). On retrouve une fuite du complexe I vers la matrice mitochondriale, tandis que pour le complexe III, on identifie une fuite vers la matrice mitochondriale et enfin une dernière vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Murphy, 2009) **(Figure 6)**. Dans ce dernier cas, cela confère un rôle plus important aux ROS car ils n'ont que la membrane externe des mitochondries à traverser pour se retrouver dans le cytosol (Sena and Chandel, 2012).

Une augmentation de la β-oxydation, par exemple dans le cas d'un apport énergétique alimentaire important, conduit à une élévation du rapport NADH / $FADH_2$ et donc à un flux excessif d'électrons qui peuvent s'accumuler au sein de la chaine respiratoire et conduire à la formation d'$O_2^{\circ-}$, notamment au sein du complexe I.

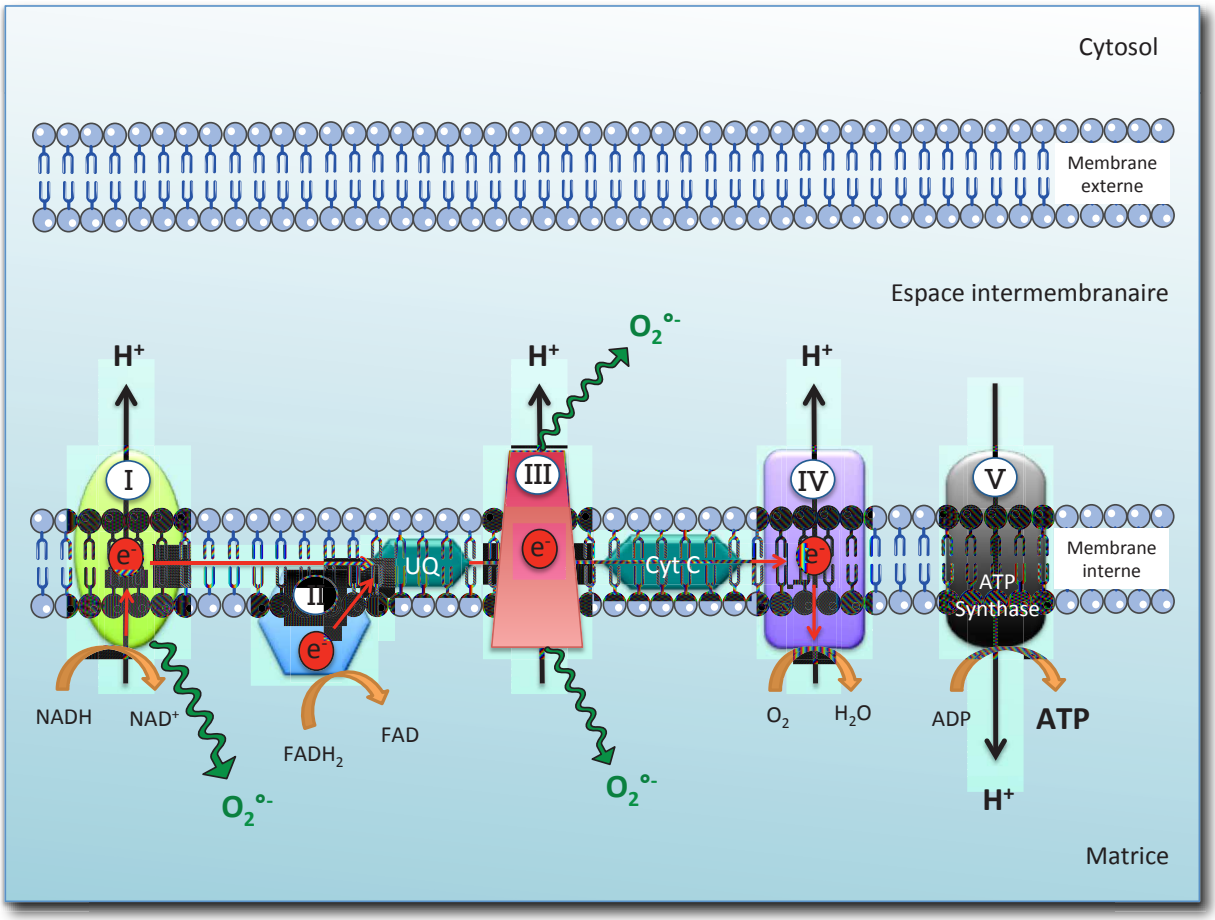


Figure 6 : Production d'anion superoxyde par la chaine de transport d'électrons de la mitochondrie (Li et al., 2013)

C.1.3.2 NADPH oxydase

La NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase) est un complexe enzymatique transmembranaire spécialisé dans la production d'$O_2^{\circ-}$ à partir d'électrons dérivés du NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire (Paclet et al., 2000).

La famille des NAPDH oxydases est représentée par cinq NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 et NOX5) ainsi que par deux Dual oxydases 1 et 2 (DUAL 1 et DUAL 2) (Lambeth, 2004; Brandes et al., 2014) **(Figure 7)**.

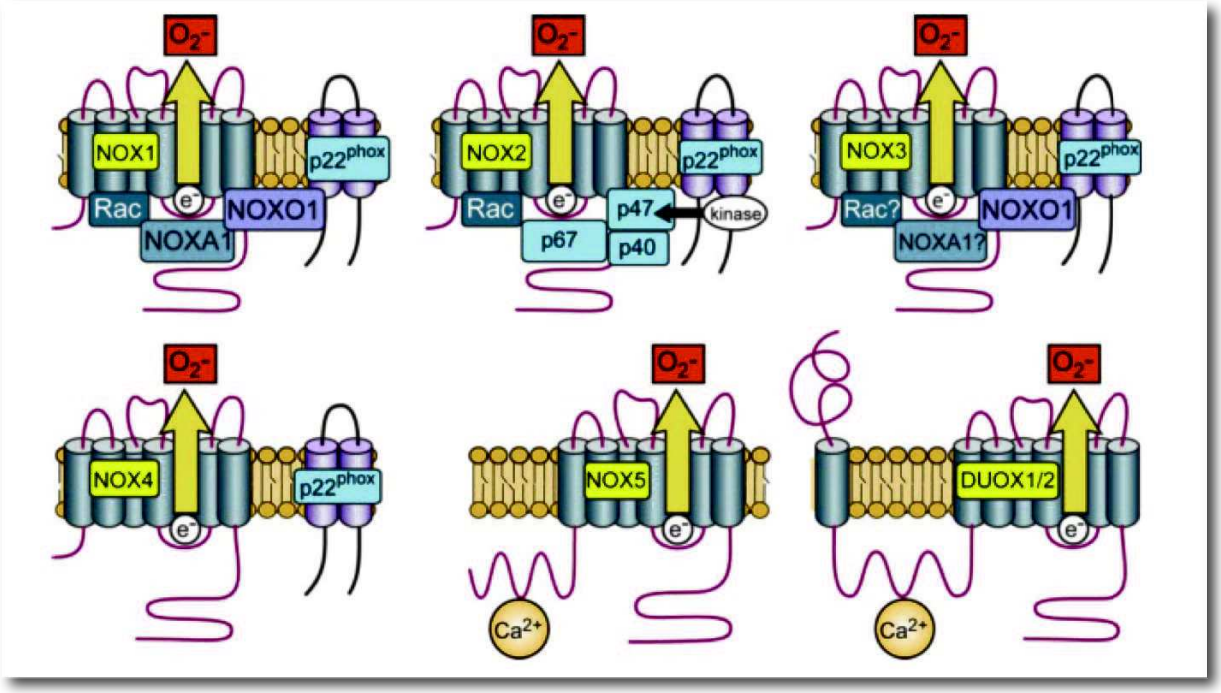


Figure 7 : *Les différentes isoformes de la NADPH oxydase* (Bedard and Krause, 2007)

Parmi les membres de cette famille, la première identifiée et caractérisée est la NOX2, retrouvée dans les cellules phagocytaires (Nauseef, 2004). Elle a un rôle non spécifique dans la défense de l'hôte contre les organismes microbiens. Elle est fonctionnelle sous forme de complexe suite à un stimulus. Cette NOX phagocytaire est composée d'un complexe catalytique membranaire avec une sous-unité, gp91^{phox} couplée à une sous-unité p22^{phox}, le tout formant le cytochrome b_{558}, et de deux sous-unités cytosoliques, p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox}, ainsi que de la GTPase Rac 1. La sous-unité p22^{phox} a un rôle d'ancrage des autres sous-unités tout en stabilisant le complexe multiprotéique (Ambasta et al., 2004).

Au repos, la NOX est inactive, c'est-à-dire que le complexe protéique n'est pas assemblé. Suite à différentes formes de stimuli, la NADPH oxydase devient active entrainant ainsi la formation d'un complexe enzymatique fonctionnel. En fait, l'activation de la NOX implique deux types de phénomènes : la phosphorylation et la translocation à la membrane des sous-unités (Touyz et al., 2003; Karimi et al., 2014). En effet, après activation de la cellule, les composantes cytosoliques p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox} subissent une phosphorylation et migrent vers la membrane pour s'associer aux facteurs membranaires gp91^{phox} et p22^{phox}. Parallèlement, la molécule Rac échange son GDP avec un GTP, puis se dissocie de son inhibiteur Rho-GDI et migre de façon indépendante à la membrane. Le cytochrome b_{558} est ensuite activé par la p67^{phox} **(Figure 8)**.

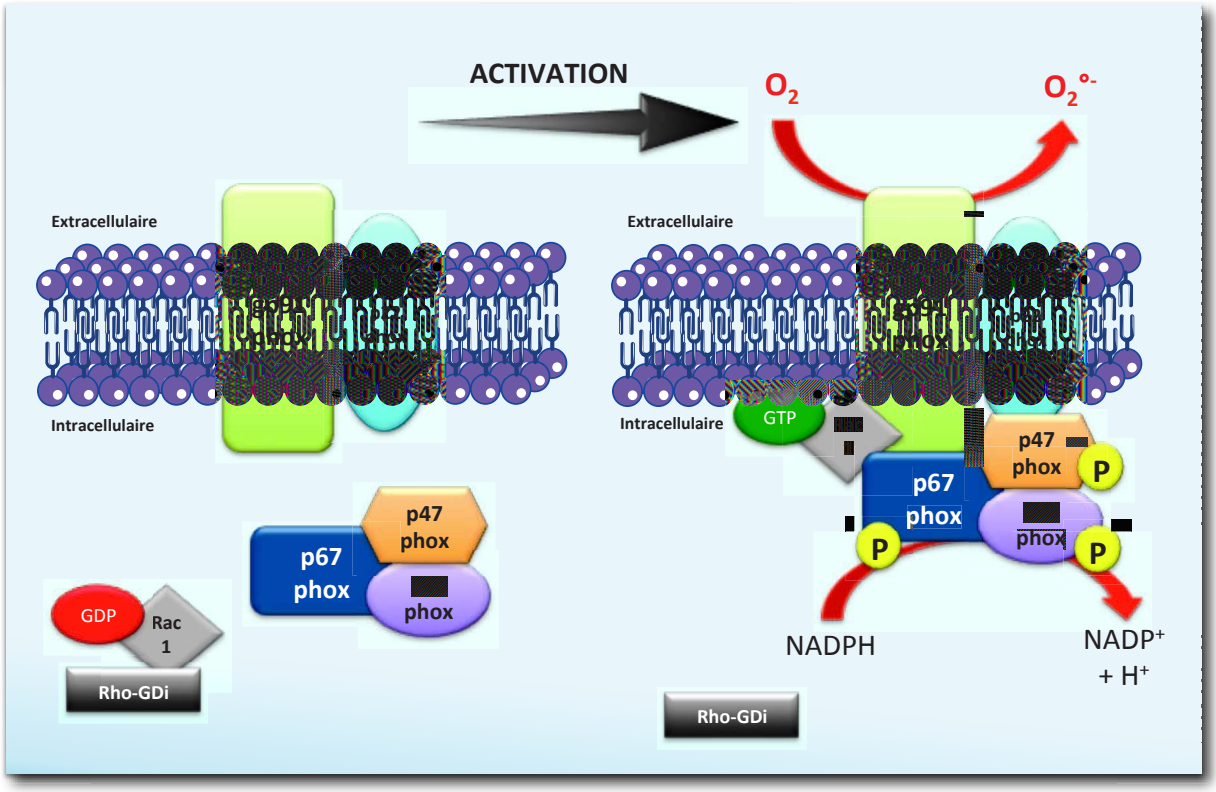


Figure 8 : *Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase* (Assari, 2006)

Malgré des similitudes de structure et de fonction enzymatique, chaque NOX a un modèle d'expression et un mécanisme d'action unique (Bedard and Krause, 2007). Quelque soit l'isoforme considérée, les différentes NOX catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire. Les NOX ont toutes des spécificités de localisation tissulaire et cellulaire ainsi que des rôles physiologiques différents **(Tableau 3)**.

Tableau 3 : *Distribution tissulaire des différentes isoformes de la NADPH oxydase* (Bedard and Krause, 2007)

Isoformes	Niveau d'expression élevé	Niveau d'expression intermédiaire à faible
NOX1	Côlon	Muscle lisse, endothélium, utérus, placenta, prostate, ostéoclastes, péricytes rétiniens
NOX2	Phagocytes	Lymphocytes B, neurones, cardiomyocytes, muscle squelettique, hépatocytes, endothélium, cellules souches hématopoïétiques, muscle lisse
NOX3	Oreille interne	Rein fœtal, rate fœtale, os crânien, cerveau
NOX4	Reins, vaisseaux sanguins	Ostéoclastes, endothélium, muscle lisse, cellules souches hématopoïétiques, fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, neurones
NOX5	Tissu lymphoïde, Testicules	Endothélium, muscle lisse, pancréas, placenta, ovaires, utérus, estomac, tissus fœtaux
DUOX1	Thyroïde	Epithélium respiratoire, épithélium lingual, cervelet, testicules
DUOX2	Thyroïde	Glandes salivaires et rectales, épithélium gastro-intestinal, épithélium respiratoire , utérus, îlots pancréatiques

De manière générale, les facteurs de risque de l'athérosclérose, que nous détaillerons en fin de chapitre, sont des activateurs potentiels des NOX et donc responsables de l'apparition d'un stress oxydant (Ray and Shah, 2005).

C.1.3.3 NO synthase

La NO synthase (NOS) est l'enzyme responsable de la formation de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'arginine. Il existe trois isoformes de la NOS : la forme neuronale (nNOS), la forme inductible (iNOS) et la forme endothéliale (eNOS).

La eNOS, retrouvée spécifiquement au niveau vasculaire, se présente sous la forme d'un homo-dimère, et a pour particularité de fonctionner selon deux modes : couplé (mode physiologique) ou découplé (mode pathologique) **(Figure 9)**. En mode couplé, lorsque l'apport en tétrahydrobioptérine (BH_4) et en arginine est suffisant, les deux sous-unités oxygénases de l'enzyme fonctionnent ensemble et produisent du NO à partir de l'arginine, grâce aux flux d'électrons. En revanche, en mode découplé, caractérisé par une déficience en BH_4, un apport insuffisant en arginine et une accumulation d'inhibiteurs endogènes de eNOS, les deux sous-unités oxygénases de la eNOS, fonctionnent indépendamment pour produire

simultanément du NO et de l'$O_2^{\circ-}$. Ces deux entités réagissent ensemble immédiatement afin de former des peroxynitrites ($ONOO^-$), puissants pro-oxydants (Rasmusen et al., 2005). Ces derniers renforcent le découplage de la NOS, en oxydant le BH_4 qui est un cofacteur essentiel qui conduit au découplage de l'enzyme lorsqu'il est absent (Milstien and Katusic, 1999).

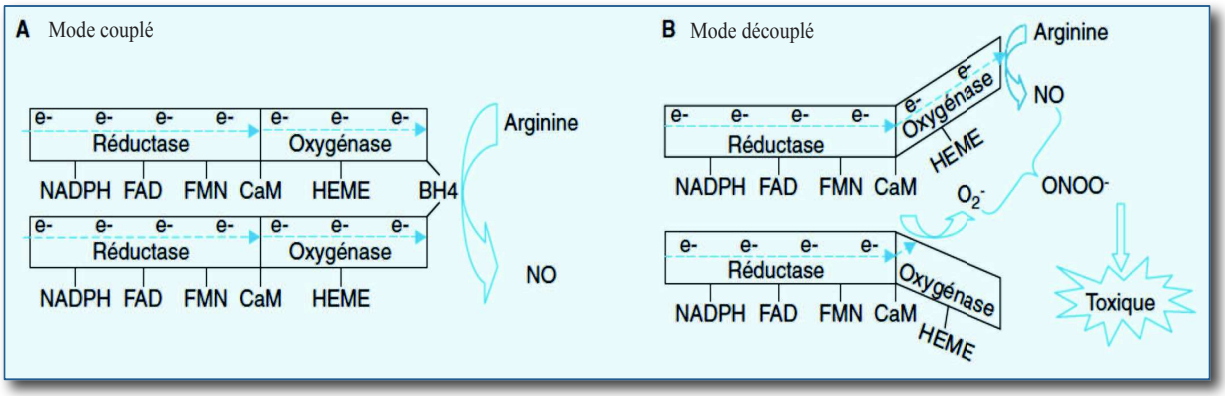


Figure 9 : *Découplage des eNOS à l'origine de la production des peroxynitrites* (Rasmusen et al., 2005)

C.1.3.4 Autres sources de ROS

Mises à part les NOX, responsables majeures de la production d'$O_2^{\circ-}$, d'autres enzymes peuvent également générer des radicaux libres. Ces enzymes sont traitées succinctement dans cette partie.

Les xanthines oxydases (XO) sont des protéines enzymatiques ubiquitaires, catalysant la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique au cours du métabolisme des purines. Cette enzyme est ainsi capable de générer l'$O_2^{\circ-}$ et le H_2O_2 en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons (George and Struthers, 2009).

Les lipoxygénases (LO) sont des enzymes catalysant des acides gras polyinsaturés. La 12/15-Lipoxygénase (12/15-LO) et la 5-Lipoxygénase (5-LO) sont les formes les plus étudiées en raison de leur profil d'expression dans les cellules inflammatoires et endothéliales (Zhao and Funk, 2004). En effet, la 12/15-LO est retrouvée principalement dans les vaisseaux sanguins (Kühn and O'Donnell, 2006), et la 5-LO dans les macrophages et les cellules spumeuses (Lötzer et al., 2005). Ces lipoxygénases contrôlent la biosynthèse des leucotriènes issus de

l'acide éicosatétraénoïque. Les ROS sont donc produites durant les étapes de la biosynthèse des leucotriènes.

Les cyclo-oxygénases (COX) sont également impliquées dans la synthèse des éicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique et sont également capables de générer l'$O_2^{\circ-}$ dans certaines conditions pathologiques.

Le réticulum endoplasmique est également un lieu de production de ROS. Il contient des enzymes, dont celles liées au cytochrome P450, qui oxydent les acides gras insaturés et produisent des ROS.

C.1.4 Le stress oxydant et les dégâts cellulaires

Dans les conditions pathologiques, le stress oxydant induit la génération excessive de ROS. Ces dernières sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de lésions oxydatives au niveau moléculaire (ADN, protéines, lipides) pouvant affecter considérablement les mécanismes du maintien de l'homéostasie cellulaire.

Les lipides membranaires sont les premières cibles des ROS. Leur sensibilité à l'oxydation est corrélée à leur degré d'insaturation (Pamplona et al., 2000). La peroxydation lipidique induit un mécanisme en chaine de dégradation des acides gras au sein de la membrane, conduisant à la formation d'hydroperoxydes qui sont eux-mêmes instables et réactifs. Les isoprostanes et le malondialdéhyde (MDA) en outre, sont formés au cours de ce processus. Cette peroxydation lipidique entraine une dysfonction membranaire, caractérisée par une diminution de la fluidité et de la perméabilité (Hong et al., 2004).

Les protéines peuvent également subir une oxydation qui passe par l'ajout d'un groupement carbonyle sur la protéine. Ces groupements peuvent être générés soit par oxydation directe des acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de la peroxydation lipidique. Ces modifications induisent des pertes de fonctions et stimulent l'activité protéolytique du protéasome (Levine, 2002).

Les ROS possèdent une grande affinité de réaction avec certaines bases de l'ADN. Ainsi, cette oxydation de l'ADN induit des mutations pathogènes au sein du génome. Par exemple, ces mutations peuvent toucher les gènes codant des protéines impliquées dans la chaine de respiration de la mitochondrie et provoquer l'exacerbation de la fuite électronique mitochondriale et par conséquent la production de ROS.

En plus des dommages directs agissant sur les macromolécules biologiques, les ROS peuvent aussi réguler plusieurs voies de signalisation cellulaire. En effet, elles sont capables de moduler l'activité des protéines tyrosines kinases, notamment les protéines de la famille des MAPKs (Mitrogen Activated Protein Kinases), avec pour conséquences une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'inflammation (Kim and Choi, 2010). De plus, les ROS peuvent également activer directement différents facteurs de transcription comme le NF-κB, impliqué dans la régulation de gènes liés à l'inflammation et le contrôle du cycle cellulaire (Bubici et al., 2006).

C.2 Rôle des lipoprotéines

Les lipides sont des molécules hydrophobes, c'est-à-dire insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Afin d'être transportés à travers les différents compartiments extracellulaires de l'organisme, ces composés lipidiques (cholestérol non estérifié, esters de cholestérol, triglycérides (TG) et phospholipides) s'assemblent avec des protéines, les apoprotéines, pour former un complexe macromoléculaire, nommé lipoprotéine **(Figure 10)**.

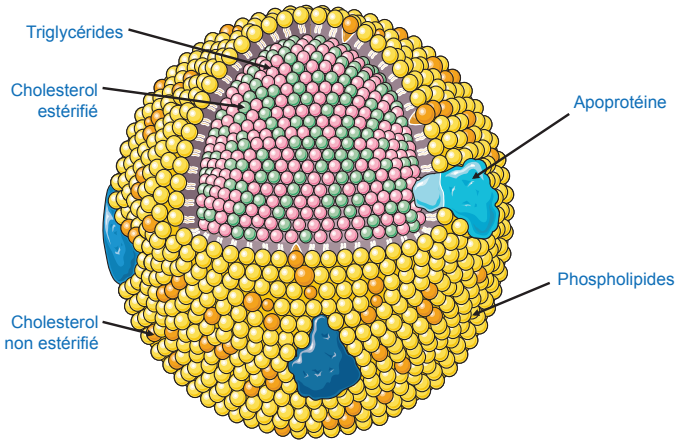


Figure 10 : *Structure générale d'une lipoprotéine* (source : http:/www.servier.fr)

Toutes les lipoprotéines ont une structure de base identique, formant une sphère, avec une certaine organisation qui permet la « solubilité des lipides ». En surface, on trouve les protéines hydrophiles, les phospholipides et le cholestérol non estérifié et à l'intérieur de la sphère, du cholestérol estérifié et des triglycérides sont présents.

Ces lipoprotéines sont de plusieurs types, différenciées par leurs densités, leurs diamètres et leurs poids moléculaires. La différence de densité est due à la proportion en protéines. En effet, plus le complexe macromoléculaire contient de protéines, plus la densité est importante, et plus il contient de lipides plus la densité est faible. A l'heure actuelle, on distingue cinq populations plasmatiques de lipoprotéines, avec des caractéristiques physico-chimiques propres : les chylomicrons, les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les IDL (Intermediate Density Lipoprotein), les LDL et les HDL (High Density Lipoprotein) **(Tableau 4)**. On retrouve également une autre lipoprotéine, la lipoprotéine(a) (Lp(a)). Il s'agit, en fait, d'une particule de LDL modifiée. Comme les LDL, la Lp(a), contenant l'Apo(a) (Apolipoprotéine (a)), se compose d'esters de cholestérol (partie lipidique) et de l'Apolipoprotéine B_{100} ($ApoB_{100}$) (partie protéique). Un pont disulfure permet de lier l'Apo(a) à l'$ApoB_{100}$. Ce lien ne peut être détruit que par une puissante réduction, inexistante dans des conditions physiologiques. Cette Apo(a) est synthétisée dans le foie et lorsqu'elle est relâchée dans la circulation, celle-ci se greffe aux LDL. Il a été largement montré que la Lp(a) est associée au développement des MCV (Koschinsky and Boffa, 2014; O'Donoghue et al., 2014).

Tableau 4 : *Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (CE : Cholestérol estérifié ; TG : Triglycérides)*

(Lagrost et al., 2005; Rader and Hobbs, 2005)

Type de lipoprotéines	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Proportion CE / TG	Principales apoprotéines
Chylomicrons	0,93	75 - 1200	1 / 19	B_{48}, E, C
VLDL	0,93 - 1,006	30 - 80	1 / 3,3	B_{100}, E, C
IDL	1,006 - 1,019	27 - 35	1 / 3,5	B_{100}, E
LDL	1,019 - 1,063	18 - 27	1 / 0,23	B_{100}
HDL	1,063 - 1,210	7 - 9	1 / 0,19	AI, AII, C

Le métabolisme des lipides est complexe et fait intervenir de nombreux récepteurs et enzymes. Trois voies essentielles permettent de contrôler ce métabolisme. La voie exogène qui permet le transport des lipides issus du bol alimentaire de l'intestin vers le foie, la voie endogène transportant les lipides du foie vers les tissus périphériques et le transport inverse du cholestérol qui assure le retour des lipides des tissus vers le foie.

Les lipides provenant du bol alimentaire sont hydrolysés dans l'intestin grêle pour être absorbés par les cellules épithéliales intestinales. Les lipides y seront de nouveau estérifiés et seront assemblés à l'aide de l'Apolipoprotéine B_{48} ($ApoB_{48}$), élément nécessaire pour former les chylomicrons. Ces derniers sont alors sécrétés dans la lymphe et se retrouvent dans la circulation générale. Sous l'action de la lipoprotéine lipase endothéliale (LPL), activée par l'Apolipoprotéine CII (ApoCII) contenue dans les chylomicrons, les TG des chylomicrons sont hydrolysés et captés par les tissus périphériques, notamment le muscle et le tissu adipeux, pour y être stockés ou dégradés à des fins énergétiques. Il en résulte des chylomicrons riches en Apolipoprotéine E (ApoE) et en esters de cholestérol, les chylomicrons « remnants ». Ces derniers sont captés au niveau du foie *via* le récepteur R-LDL, qui reconnaît l'ApoE. A ce niveau, les esters de cholestérol sont excrétés dans les canalicules biliaires ou utilisés par le foie pour la synthèse de nouvelles lipoprotéines, comme par exemple les VLDL **(Figure 11)**.

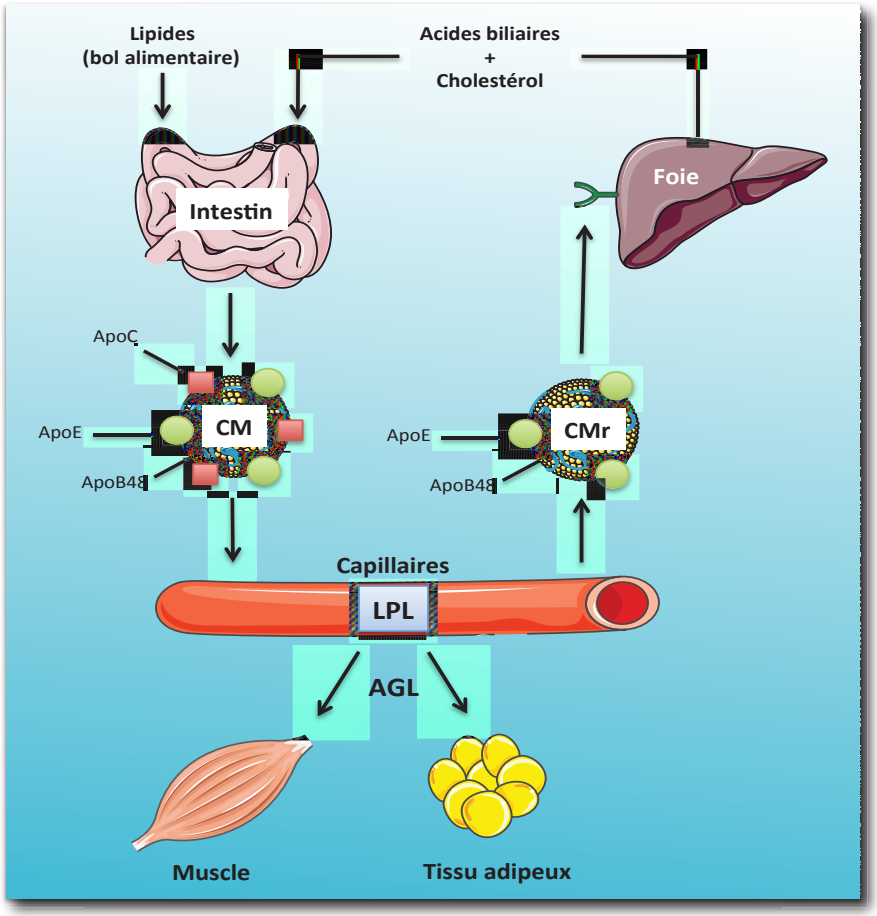


Figure 11 : *Voie métabolique exogène des lipoprotéines*

(CM : Chylomicrons ; CMr : Chylomicrons « remnants » ; AGL : Acides gras libres)

(Rader and Hobbs, 2005)

La synthèse et la sécrétion hépatique de ces VLDL se fait autour de l'ApoB$_{100}$. Une fois dans la circulation sanguine, les VLDL, comme les chylomicrons, sont soumises à l'action de la LPL au niveau des capillaires, également activée par l'ApoCII. Cette LPL hydrolyse les TG en acides gras pour fournir l'énergie aux muscles et être stockés dans le tissu adipeux. Les résidus des VLDL, les IDL, sont majoritairement captés au niveau du foie par des récepteurs capables de reconnaître l'ApoE et l'ApoB. Les IDL restantes perdent leur ApoE et leurs TG sont hydrolysés sous l'action de la lipase hépatique (LH). Ceci aboutit à la formation des LDL qui sont donc appauvries en TG mais riches en esters de cholestérol et qui ne contiennent que l'ApoB$_{100}$ à leur surface. Elles permettent le transport de cholestérol vers les tissus périphériques et son internalisation par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à l'ApoB$_{100}$. Une fois fixées à leurs récepteurs, les LDL sont internalisées dans une vésicule d'endocytose où les constituants lipidiques et protéiques sont dégradés. Ce mécanisme assure à la cellule un

apport substantiel de cholestérol, qui, par sa concentration intracellulaire, régule la synthèse des récepteurs aux LDL **(Figure 12)**.

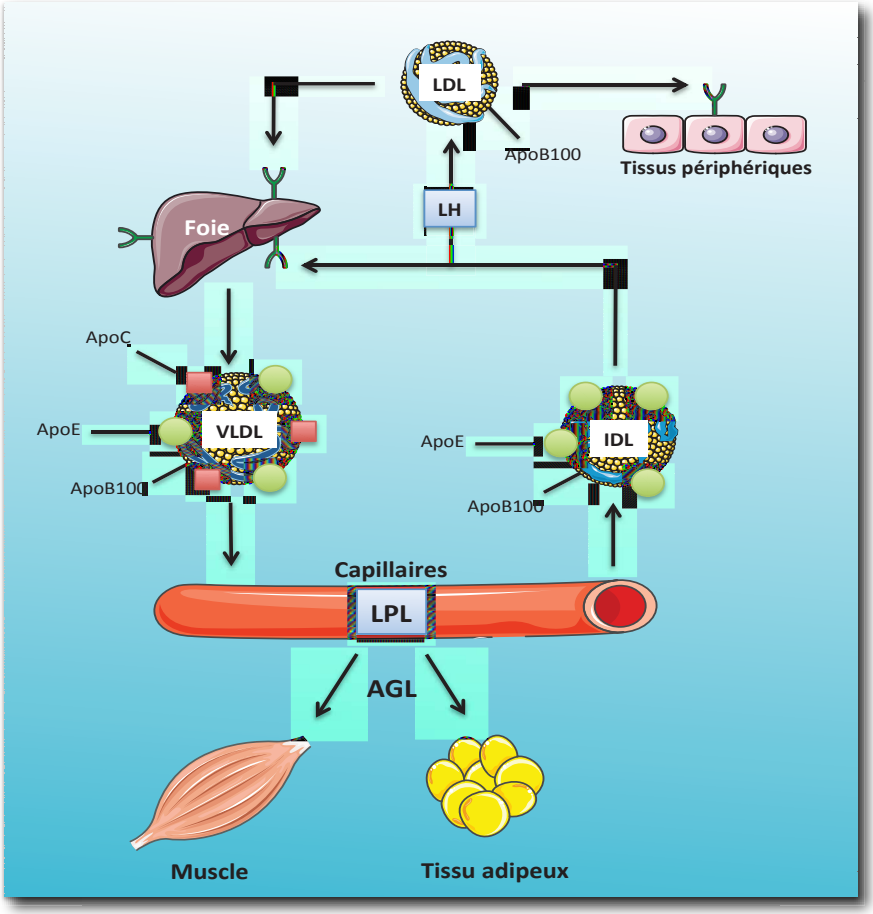


Figure 12 : *Voie métabolique endogène des lipoprotéines (AGL : Acides gras libres)* (Rader and Hobbs, 2005)

Afin d'assurer l'élimination du cholestérol excédentaire par la bile, ce dernier est ramené au niveau hépatique par l'intermédiaire des lipoprotéines HDL. Les HDL naissantes sont issues du foie et de l'intestin et proviennent également du métabolisme des chylomicrons et des VLDL. Elles sont majoritairement composées d'Apolipoprotéine A1 (ApoA1) et de phospholipides mais elles s'enrichissent rapidement en cholestérol non estérifié provenant des tissus périphériques. Une fois incorporé dans les HDL naissantes, le cholestérol sera estérifié par l'intermédiaire d'une enzyme plasmatique associée aux HDL, la LCAT (Lecithine-Cholestérol-AcylTransférase). Cette étape aboutit à la formation des HDL matures riches en esters de cholestérol. A ce stade, ces derniers peuvent être transférés aux VLDV et aux chylomicrons en échange de TG sous l'action de la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) et repartir dans la voie de métabolisme endogène ou être captés par le foie. La captation des

esters de cholestérol des HDL par les hépatocytes est l'étape finale de la voie du transport inverse. Cette étape met en jeu les récepteurs SRB1 (Scavenger Receptor Class B1). Les HDL qui entrent dans les hépatocytes sont métabolisées et directement dirigées vers les canalicules biliaires **(Figure 13)**.

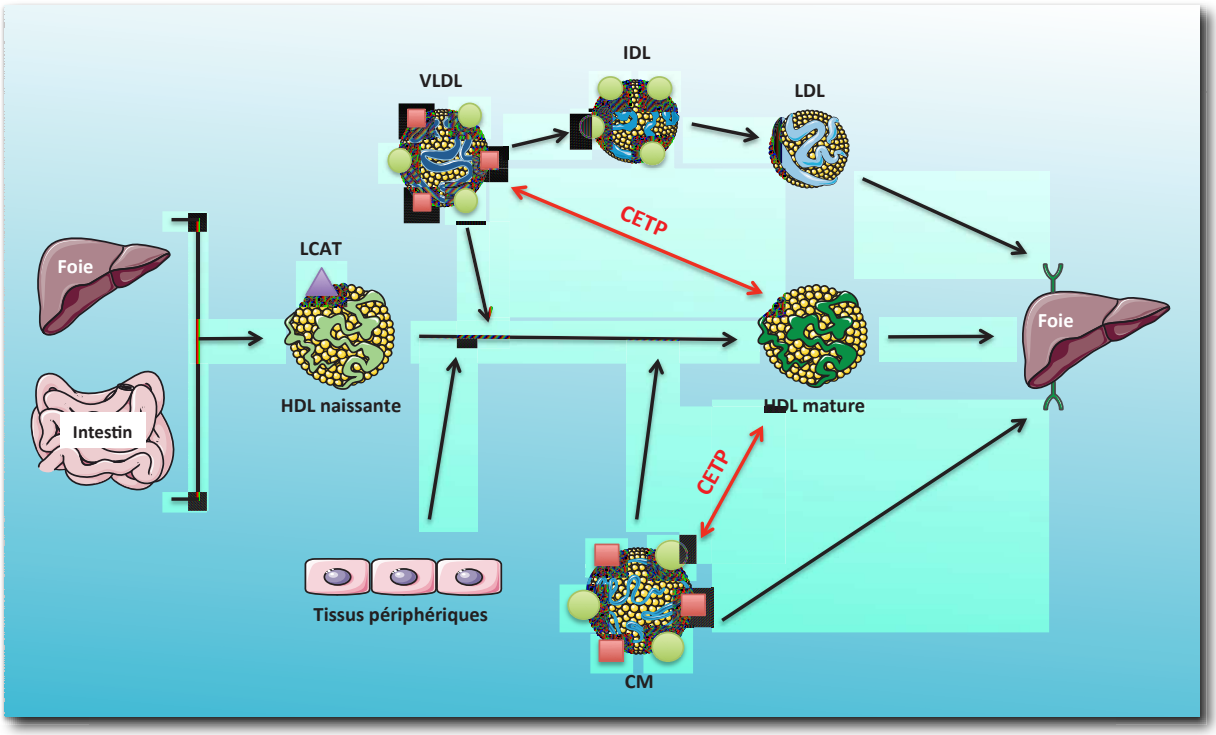


Figure 13 : *Voie métabolique de formation des HDL et transport inverse du cholestérol* (Rader and Hobbs, 2005)

La notion d'hyperlipidémie est étroitement liée au risque de développement de l'athérosclérose. Ce risque est principalement lié aux concentrations de LDL circulantes. En effet, ces LDL en concentration excessive peuvent s'accumuler au sein des parois artérielles et initier la formation des stries lipidiques, d'où leur caractère athérogène. Les HDL quant à elles, sont considérées comme athéro-protectrices, *via* le transport inverse du cholestérol mais également *via* ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Cutri et al., 2006).

C.3 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) mais aussi par une augmentation du stress oxydant suite à divers stimuli physiques et/ou chimiques. Cette dysfonction endothéliale

survient souvent de façon précoce dans le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires (Taddei et al., 2003; Raij, 2006) et notamment lors de l'athérosclérose où elle est considérée comme une étape clé dans l'initiation des lésions athéromateuses.
Une majorité des facteurs de risque traditionnels liés à l'athérosclérose (hypertension artérielle, tabac, hyperglycémie, etc.) peut également déclencher ou potentialiser une dysfonction endothéliale existante.

L'ensemble des vaisseaux sanguins de l'organisme est tapissé d'une monocouche de cellules endothéliales, formant l'endothélium vasculaire. Ce dernier constitue une barrière semi-perméable entre les éléments circulants du sang et la paroi des vaisseaux sanguins.
Cet endothélium produit des substances vasoactives (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) permettant de maintenir un tonus vasculaire approprié. En condition physiologique, il existe un équilibre entre ces facteurs vasoactifs afin de maintenir le tonus vasculaire.
Parmi les substances vasoconstrictrices relâchées par les cellules endothéliales, on trouve l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AgII), le thromboxane A2 (TxA2) et les ROS. Parallèlement, l'endothélium a la capacité de produire des substances vasodilatatrices telles que le NO, la prostacycline (PGI_2), et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) **(Figure 14)**.

La plupart des substances vasoconstrictrices exercent leurs effets par action directe sur les CML de la paroi vasculaire. En effet, dans la majorité des cas, la contraction est due à une hausse de la concentration calcique intracellulaire. Cette augmentation fait suite à l'activation de la phospholipase C (PLC) qui stimule la voie IP-3 (Inositol triphosphate) / DAG (Diacylglycérol). L'activation de la PLC est directement couplée à la fixation du ligand sur son récepteur, retrouvé principalement au niveau des CML.

L'ET-1 est le plus puissant agent vasoconstricteur. Elle est produite et sécrétée par l'endothélium dont la production est augmentée par divers stimuli, tels que les forces de cisaillement, des facteurs neuro-humoraux et des cytokines. Son action vasoconstrictrice passe par l'activation de la voie IP-3 / DAG. Sa production par l'endothélium est contrebalancée par la production de NO.

L'AgII est un peptide essentiellement produit et sécrété par le rein, issu d'une conversion enzymatique de l'angiotensine I. Ce peptide joue un rôle fondamental dans le maintien de la

pression artérielle. En effet, son action vasoconstrictrice peut être multiple. L'AgII peut directement se fixer à ses récepteurs sur les CML activant ainsi la PLC. En se fixant sur les cellules endothéliales il permet la production de l'ET-1 par ces dernières mais aussi de la TxA2. Enfin, l'AgII a également la capacité de diminuer la biodisponibilité du NO, entrainant ainsi une contraction de l'artère.

La TxA2 est issu de l'acide arachidonique, formée dans les cellules endothéliales par la voie des cyclo-oxygénases. Elle active la PLC en se fixant sur les CML entrainant une contraction de l'artère.

Les ROS produites par les différents types cellulaires vasculaires, et plus particulièrement l'$O_2^{\circ-}$, agissent soit directement, en tant que vasoconstricteurs (Katusic et al., 1993), soit indirectement en potentialisant les réponses contractiles, en réduisant d'une part la biodisponibilité du NO (Rubanyi and Vanhoutte, 1986), et d'autre part en activant les COX dans les CML (Hibino et al., 1999).

La PGI_2 est issue de l'acide arachidonique, formée dans les cellules endothéliales par la voie des cyclo-oxygénases (voie parallèle à la formation des TxA2). La PGI_2 active l'adényl cyclase (AC) des CML entrainant une augmentation des concentrations de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc), responsable de la relaxation. La PGI_2 est aussi un puissant antiagrégant plaquettaire.

Les effets vasodilatateurs de l'EDHF passent par une hyperpolarisation des CML, dépendante de l'endothélium, responsable de la relaxation. Il est libéré par l'endothélium suite à des stimuli tels que la bradykinine, l'acétylcholine (ACh). Son activité hyperpolarisante passe par des canaux potassiques dépendants du calcium.

Le NO est le plus important médiateur vasoprotecteur sécrété par l'endothélium (Wheatcroft et al., 2003). En effet, au niveau de la cellule endothéliale, le NO inhibe la production d'ET-1, l'oxydation des LDL, l'expression de molécules d'adhésion et par conséquent, l'adhésion des monocytes (Vanhoutte, 2003). A l'extérieur de la cellule, il favorise la relaxation des CML, inhibe l'agrégation plaquettaire, empêche la prolifération des CML et exerce une action anti-inflammatoire et antioxydante (Boulanger, 1999; Kurowska, 2002; Shaul, 2002; Vanhoutte, 2003). Toutes ces propriétés empêchent ainsi le développement de l'athérosclérose.

C'est pourquoi, la diminution de la biodisponibilité du NO et par conséquent la diminution de ses propriétés athéro-protectrices, ne permettent plus de protéger l'endothélium, favorisant ainsi l'initiation de l'athérogenèse.

Le NO est un gaz liposoluble synthétisé par les NOS. Il joue un rôle de médiateur en réponse à de nombreuses substances relaxantes des CML comme la bradykinine, la sérotonine, l'histamine, l'ATP et l'ACh.

Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers les CML en traversant librement les membranes cellulaires. Dans celles-ci, le NO se lie à la guanylate cyclase (GC) qui produit alors de grandes quantités de GMPc (Guanosine monophosphate cyclique). Cette dernière active la PKG (Protéine Kinase G) qui, à son tour, entraine une diminution de la concentration intracellulaire en calcium, induisant la vasorelaxation (Klinger, 2007).

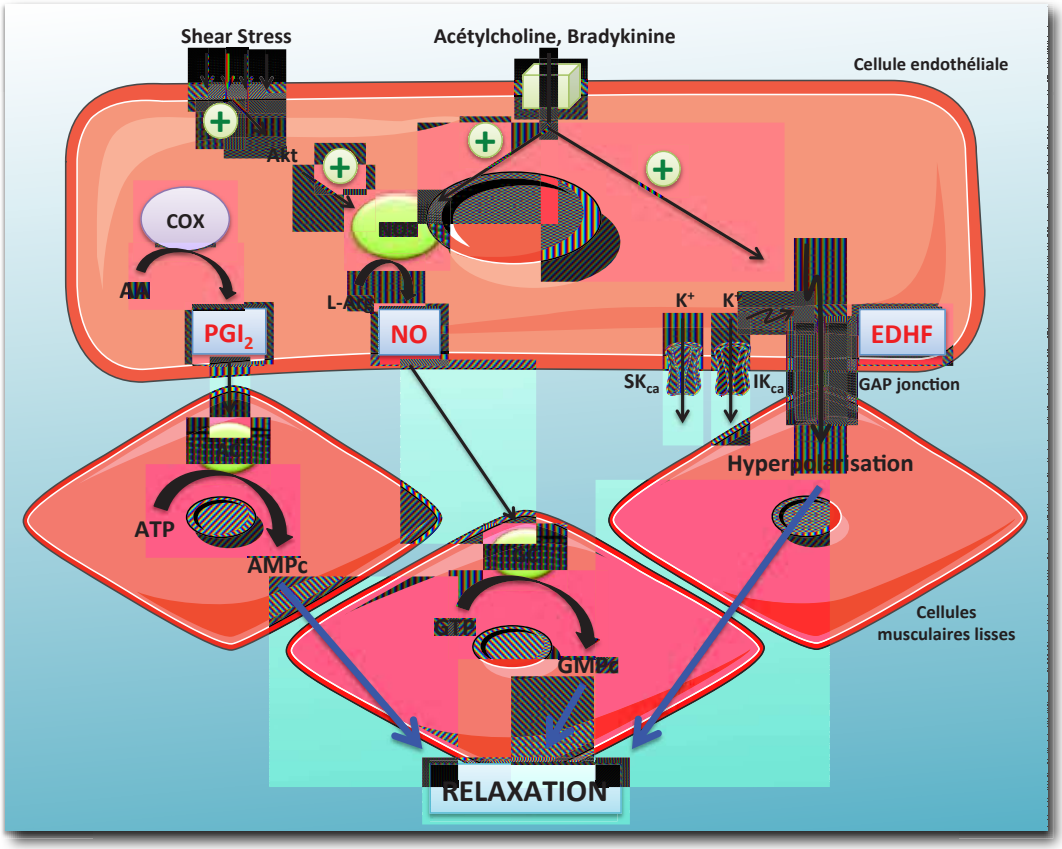


Figure 14 : *Effet des substances vasodilatatrices libérées par l'endothélium*

La eNOS peut être activée aussi bien par la voie calcium dépendante que par la phosphorylation par différentes kinases.

Au repos, la eNOS est localisée au niveau des cavéoles reliées par la cavéoline-1 qui maintient l'enzyme à l'état inactif. La liaison de substances vasodilatatrices (ACh, bradykinine) à leurs récepteurs induit une augmentation de la production d'IP-3, entrainant une hausse du calcium intracellulaire ainsi qu'une augmentation de la liaison de ce dernier à la calmoduline. Le complexe formé peut se fixer à l'enzyme eNOS et permettre sa translocation des cavéoles vers le cytoplasme, facilitant le transfert des électrons et augmentant la formation du NO (Vincent et al., 2003).

L'activation de la eNOS peut également se faire suite à des stimuli mécaniques, comme les forces de cisaillement (Shear Stress) qu'exerce le déplacement du sang sur la surface des cellules endothéliales. Ces forces orientées longitudinalement varient avec le débit sanguin local et les conditions d'écoulement. Les contraintes de cisaillement stimulent des récepteurs membranaires sensibles à l'étirement de la cellule. Via des mécano-senseurs, les forces de cisaillement activent la eNOS par un mécanisme calcium-indépendant qui nécessite la phosphorylation de la eNOS médiée par la phosphorylation de l'Akt (Protéine kinase B) (Busse and Fleming, 2003; Lehoux and Tedgui, 2004).

Parmi les multiples étiologies de la dysfonction endothéliale, la contrainte de cisaillement du flux sanguin occupe une place prépondérante dans le déséquilibre homéostatique endothélial. En effet, au niveau des zones à fortes contraintes hémodynamiques, c'est-à-dire aux endroits de courbures ou de bifurcations de l'artère, la perte du flux luminaire est responsable d'une diminution locale des forces de cisaillement (Asakura and Karino, 1990). Cette diminution provoque une augmentation de l'expression des gènes intervenant dans les différentes phases de l'athérome, tels que l'inflammation, l'accumulation de lipides, la nécrose cellulaire et le remodelage vasculaire (Passerini et al., 2004).

D Mécanismes de l'athérogenèse

D.1 Initiation de la lésion

Le développement de l'athérosclérose trouve son origine à travers deux étapes fondamentales. D'une part, la présence d'une lésion locale de l'endothélium, donnant lieu à une dysfonction

endothéliale, et d'autre part, la pénétration dans l'espace sous-endothélial, l'*intima*, de lipoprotéines athérogènes subissant des modifications oxydatives. Ces deux étapes vont s'auto-amplifier.

La première étape a été traitée dans le chapitre C.3. Concernant la seconde étape, elle intervient dans la formation de la lésion athéromateuse, c'est-à-dire la pénétration et l'accumulation des LDL au niveau de l'*intima* de l'artère.

Le pouvoir athérogène de ces LDL dépend de diverses caractéristiques, comme la concentration sanguine circulante de ces LDL mais aussi de leurs tailles. En effet, les LDL petites et denses ont la capacité de pénétrer plus facilement et plus rapidement au niveau de l'*intima* (Carmena et al., 2004), ce qui explique leur pouvoir athérogène.

Ces types de lipoprotéines possèdent une affinité réduite pour les récepteurs des LDL, une sensibilité à l'oxydation plus grande, ainsi qu'une affinité accrue pour les protéoglycanes.

Cette accumulation de LDL se fait par diffusion passive au travers des jonctions serrées de l'endothélium pour se retrouver dans l'espace sous-endothélial.

Un phénomène de rétention permet de piéger les lipoprotéines dans l'*intima*. Celle-ci est rendue possible grâce à l'interaction électrostatique entre les régions basiques de l'$ApoB_{100}$ des LDL et les groupements sulfatés chargés négativement portés par les protéoglycanes de la MEC (Fogelstrand and Borén, 2012).

Cependant, comme les LDL sous leurs formes natives ne sont pas reconnues assez rapidement par les macrophages pour former les cellules spumeuses, il a donc été supposé que ces LDL subissent d'une manière ou d'une autre des modifications au sein de l'artère (Goldstein et al., 1979).

Ces LDL piégées dans la matrice subissent différents remaniements tels que la lipolyse, la protéolyse, l'agrégation et l'oxydation. Cette dernière constitue la principale modification impliquée dans l'initiation de la formation de la plaque d'athérome (Tamminen et al., 1999), ce qui contribue à l'apparition de l'inflammation et à la formation de cellules spumeuses.

Cette oxydation au sein de l'*intima* est due à la formation de ROS produits par tous les types cellulaires vasculaires (cellules endothéliales, CML, monocytes/macrophages). Les lipoxygénases (Glass and Witztum, 2001) et les NOX jouent aussi un rôle majeur dans cette oxydation, dans laquelle les XO, la myéloperoxydase (MPO), les NOS et la chaine respiratoire mitochondriale sont également impliquées **(Figure 15)**.

L'oxydation des LDL induit une fragmentation de l'ApoB et des résidus de lysine, ce qui conduit à une non reconnaissance de ces LDL par leurs récepteurs normaux, les R-LDL.

Ces réactions d'oxydation donnent naissance en premier lieu à des LDL « modérément oxydées ou modérément modifiées » (LDLmm), qui ont une activité pro-inflammatoire, mais qui ne seront pas suffisamment modifiées pour être reconnues par les macrophages (Cyrus et al., 1999) et ainsi former les cellules spumeuses.

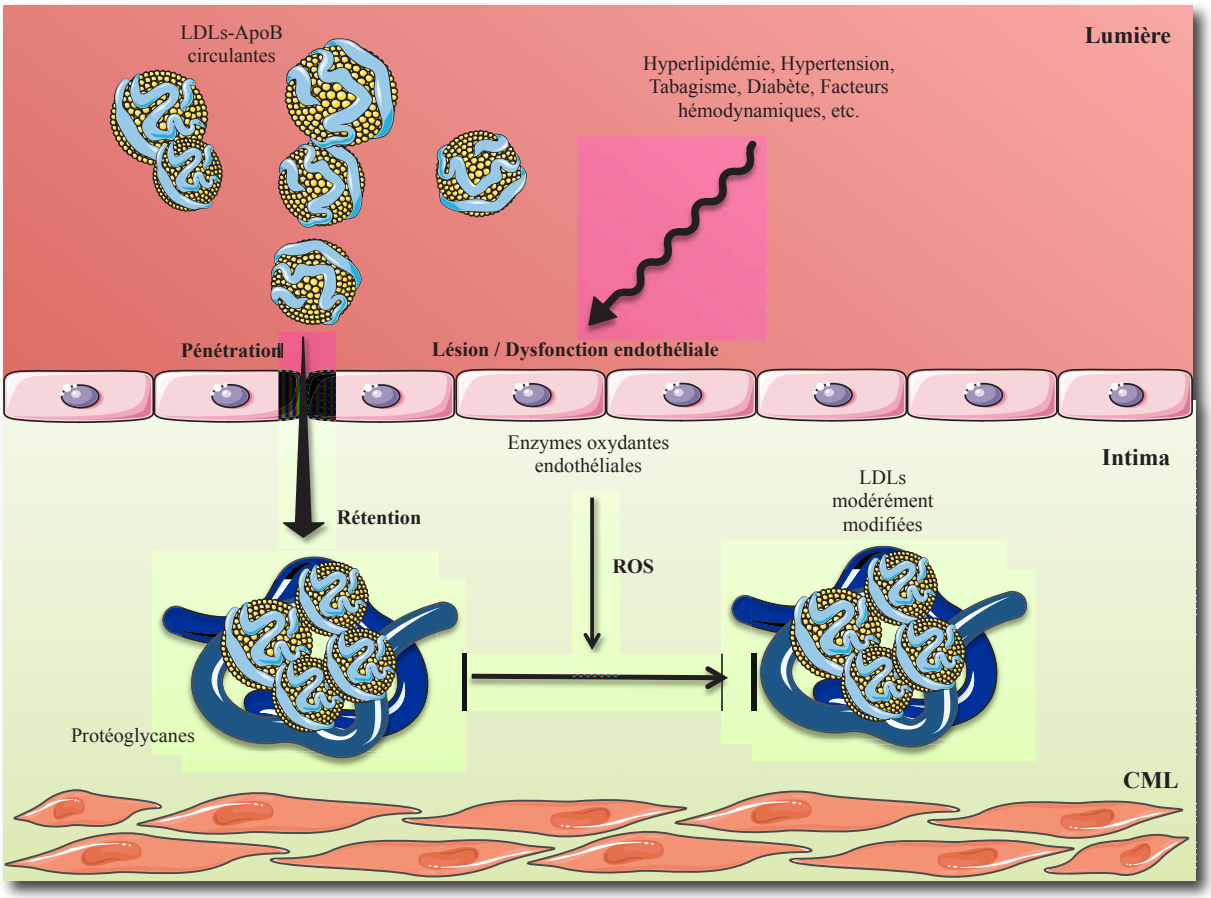


Figure 15 : *Initiation de la lésion athéromateuse*

D.2 Progression de la lésion

Ces modifications par oxydation des LDL ont deux grandes conséquences : premièrement, des activités pro-inflammatoires *via* l'activation des cellules endothéliales amenant finalement au recrutement de monocytes et deuxièmement, la formation des cellules spumeuses.

D.2.1 Réaction inflammatoire

L'endothélium d'une artère saine a des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-thrombotiques. La présence de LDL « modérément modifiées » dans l'espace sous-endothélial altère les fonctions endothéliales, ce qui a pour conséquence l'expression de substances pro-inflammatoires permettant l'attraction, l'adhérence et la pénétration de cellules sanguines circulantes telles que les monocytes et les lymphocytes T.

L'activation des cellules endothéliales par les LDLmm induit l'expression de différentes chimiokines qui interagissent avec leurs récepteurs monocytaires, et oriente ainsi la migration des monocytes sanguins au niveau du site lésionnel. Le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), une protéine chimio-attractive joue un rôle prépondérant dans le recrutement des monocytes (Bursill et al., 2004).
Par suite de l'attraction des monocytes sanguins circulants, il s'ensuit une phase de recrutement passant, dans un premier temps, par l'ancrage et le roulement des monocytes le long de l'endothélium vasculaire, et, dans un deuxième temps, par une phase d'adhésion ferme aux cellules endothéliales, et enfin, par leur transmigration endothéliale (Ley et al., 2007).

Le roulement des monocytes le long de l'endothélium se fait par l'interaction entre les protéines d'adhésion, sélectines P et E, exprimées par les cellules endothéliales activées par les LDLmm et les glucides présents à la surface des monocytes. Des souris sensibles au développement de l'athérosclérose, ne possédant pas ces sélectines, présentent une diminution de la pathologie, indiquant donc un rôle important de ces protéines dans cette maladie (Chi and Melendez, 2007).
Des intégrines telles la VLA-4 (Very Late Antigen-4) et la LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen-1) présentes à la surface des cellules immunitaires interagissent avec les molécules de la famille des immunoglobulines, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule-1), exprimées à la surface des cellules endothéliales activées (Bobryshev, 2006; Mestas and Ley, 2008). Cette étape de présentation conduit à l'adhésion ferme des monocytes sur les cellules endothéliales et permet leurs migrations au sein de l'*intima*. Ce phénomène, la diapédèse, a lieu au travers des jonctions inter-endothéliales sous l'effet de chimiokines et cytokines sécrétées par les cellules

endothéliales activées, comme le MCP-1, l'IL-8 (InterLeukine-8) et le TNF-α (Tumor Necrosis Factor-alpha).

Une fois dans l'*intima*, les monocytes ont la capacité de se multiplier et de se différencier en macrophages sous l'action de diverses cytokines. Le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), facteur de différenciation et de prolifération des monocytes, est produit localement par les cellules endothéliales activées et les CML **(Figure 16)**. Ce phénomène est essentiel dans le processus d'athérogenèse, comme l'a montré une étude sur des souris Knock-Out (KO) pour l'ApoE et déficientes en M-CSF, sur lesquelles on a observé une absence quasi totale de lésions athéromateuses (Smith et al., 1995). Le récepteur monocytaire au M-CSF pourrait être activé par les LDL oxydées au niveau de l'*intima* (Fuhrman et al., 2008).

De façon similaire aux monocytes, les lymphocytes T pénètrent également dans l'espace sous-endothélial *via* les molécules d'adhésion endothéliales sécrétées suite à l'activation de cet endothélium **(Figure 16)**. Les lymphocytes T sont minoritaires par rapport aux macrophages. Les lymphocytes T CD4, majoritairement représentés au niveau de la plaque humaine (Hansson, 2009), jouent un rôle important dans l'athérogenèse. Des souris KO ApoE dépourvues de lymphocytes T et B matures présentent des lésions athéromateuses de très petites tailles, alors que l'ajout de lymphocytes T CD4 permet un développement important de la plaque d'athérome (Zhou et al., 2000).

De par leur présentation antigénique aux cellules dendritiques ou aux macrophages, ces lymphocytes T CD4 sont activés pour se différencier en T Helper 1 (Th1), phénotype pro-inflammatoire, ou en T régulateurs (Trég), phénotype anti-inflammatoire. L'importance de la réaction inflammatoire est donc liée à l'équilibre qui se crée au sein de la plaque d'athérome entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, reflet de l'équilibre entre les lymphocytes Th1 et Trég (Wigren et al., 2012). Au niveau de la plaque, les cellules Th1 sont majoritaires et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ (Interféron gamma) et le TNF-α qui favorisent le développement de la plaque en recrutant des cellules immunitaires additionnelles perpétuant ainsi la réponse inflammatoire (Bui et al., 2009).

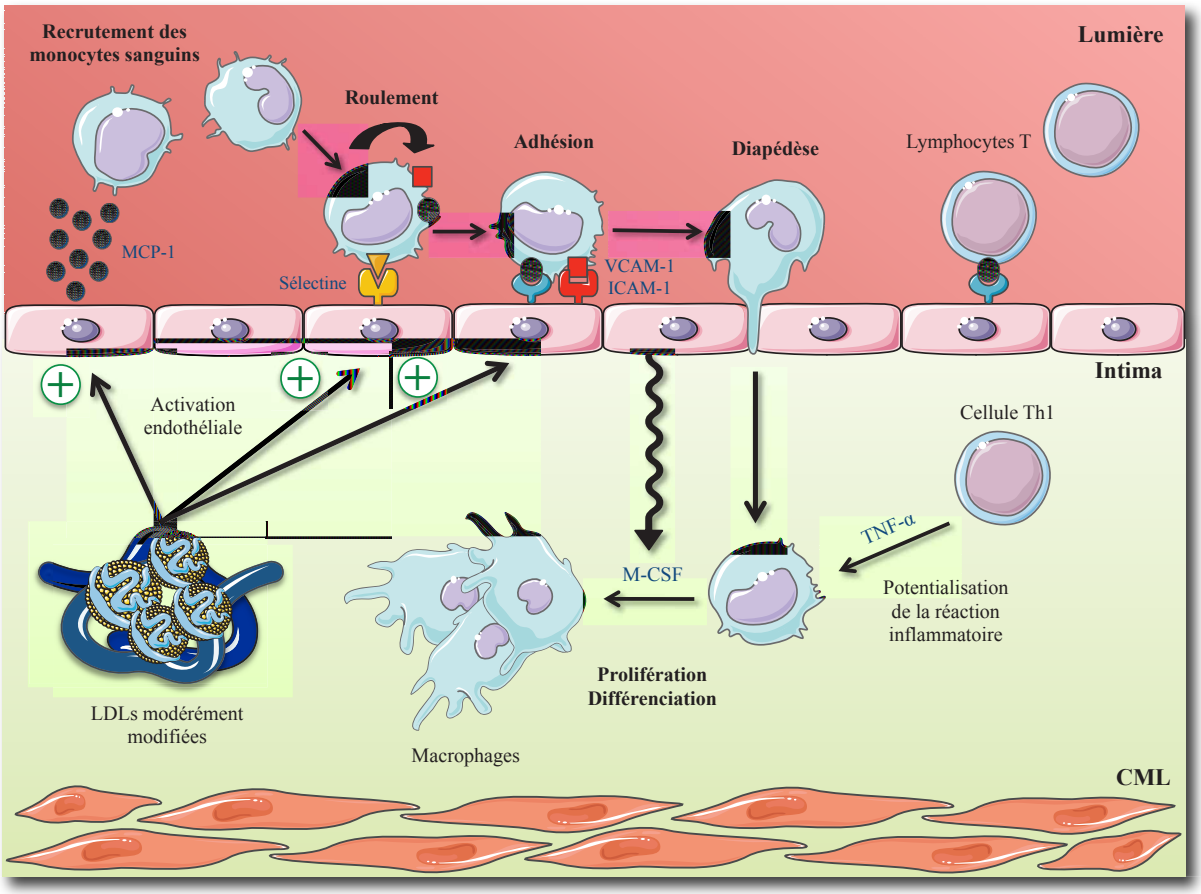


Figure 16 : *Réaction inflammatoire au cours de l'athérogenèse*

D.2.2 Formation des cellules spumeuses

Afin de pouvoir être internalisées par les macrophages, les LDLmm doivent passer à un état fortement oxydé, LDLox. Cette réaction se fait grâce aux radicaux libres et aux différentes enzymes oxydantes des cellules vasculaires, mais également grâces aux macrophages.

Une fois les LDL fortement oxydées, leurs récepteurs normaux, les R-LDL, ne sont plus capables de les reconnaître. De ce fait, les LDLox sont donc rapidement piégées et internalisées par les récepteurs scavengers (ou récepteurs éboueurs) présents à la surface des macrophages. En effet, lors de la différenciation des monocytes en macrophages, ces derniers expriment à leur surface des récepteurs spécifiques (également retrouvés sur les CML) dont la spécificité de ligands est considérable.

On retrouve une large gamme de récepteurs scavengers tels que les récepteurs CD36 et CD68, les récepteurs SR-AI/II (Type A Scavenger Receptor I et II), les récepteurs LOX-1 (Lectin-like oxLDL Receptor 1) et les TLR (Toll Like Receptor) (Hansson et al., 2006). Des études

récentes ont montré que la régulation négative de SiRNA (Small interfering RNA) de SR-A ou de CD36 chez des souris athéromateuses inhibe la formation des cellules spumeuses et l'athérosclérose (Mäkinen et al., 2010).

A l'inverse des R-LDL, les récepteurs scavengers ne sont pas régulés négativement par la concentration intracellulaire en cholestérol (De Winther et al., 2000), ce qui permet une captation de grandes quantités de LDLox, aboutissant à la formation de macrophages gorgés de cholestérol, les cellules spumeuses.

Une fois internalisées au sein des macrophages, les LDLox entrent dans les lysosomes afin de subir une hydrolyse pour former du cholestérol et des acides gras. Le cholestérol libre en excès est envoyé au réticulum endoplasmique où il sera estérifié par l'ACAT-1 (Acyl-CoA Cholesterol AcylTransferase-1). Cette réaction favorise l'accroissement d'ester de cholestérol intracellulaire **(Figure 17)**.

La formation de cellules spumeuses dépend également du transport de cholestérol, qui, en condition pathologique est dégradé, *via* une altération des transporteurs reverse du cholestérol de la famille ABC (ATP Binding Cassette Transporter) et une diminution du cholestérol HDL.

L'accumulation de cellules spumeuses, constitue ce que l'on appelle la strie lipidique, qui est le premier stade de l'athérome, apparaissant dès l'enfance. Ce phénomène est réversible mais peut également évoluer vers la plaque d'athérome.

S'ensuit la formation d'un cœur lipidique correspondant à l'agrégation intensive des cellules spumeuses.

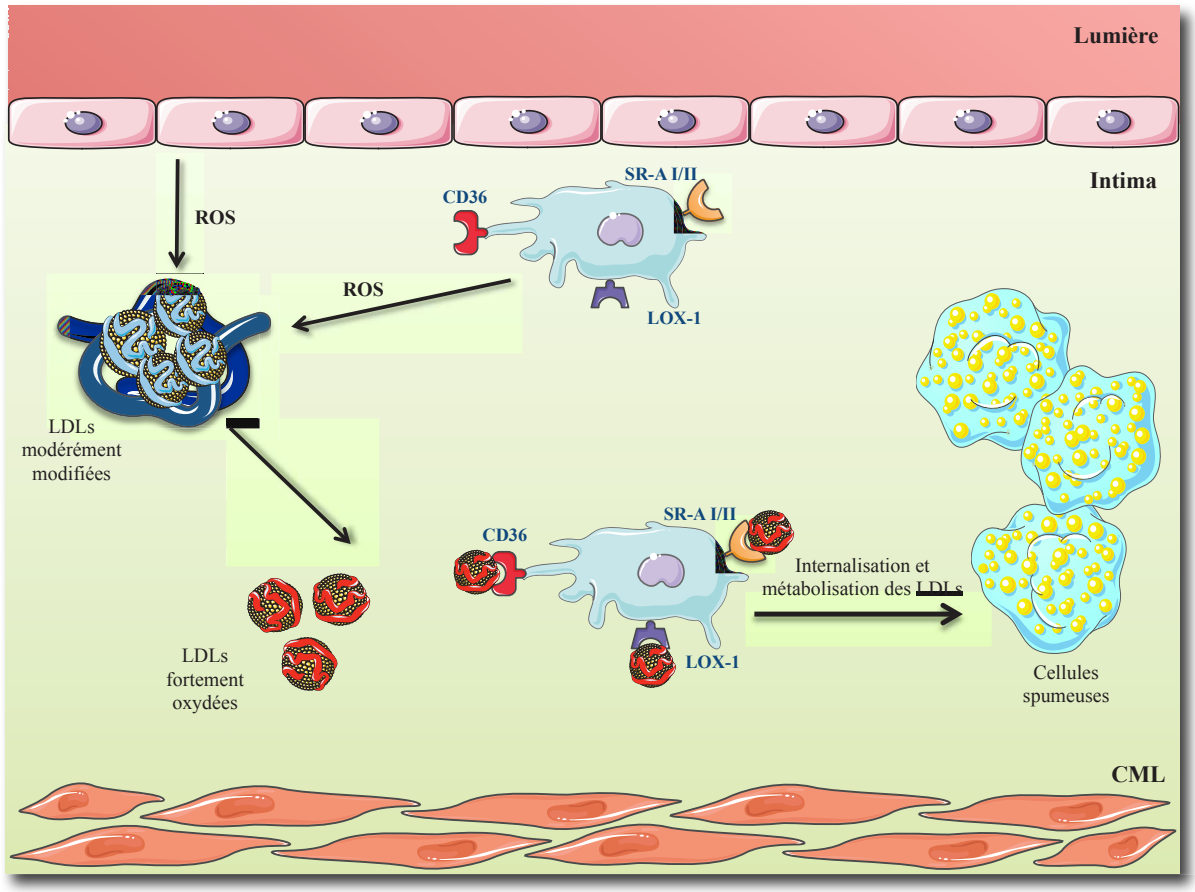


Figure 17 : *Formation des cellules spumeuses*

D.3 Complications de la lésion

La plaque athéromateuse complexe est une évolution de la strie lipidique, caractérisée par un cœur lipidique qui se nécrose avec en parallèle la formation d'une chape fibro-musculaire, isolant ainsi le cœur nécrotique de la lumière artérielle.

Au cours de la progression de l'athérosclérose, les différentes cellules vasculaires (cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes T et CML) ainsi que les cellules spumeuses meurent par apoptose. Les mécanismes impliqués sont les fortes concentrations intracellulaires de cholestérol libre, et extracellulaires de LDLox, la production de cytokines pro-apoptotiques comme le TNF-α et la production excessive de ROS (Seimon and Tabas, 2009; Tsukano et al., 2010). En général, les macrophages éliminent les cellules spumeuses et les cellules vasculaires apoptotiques par phagocytose. Ce phénomène s'appelle l'efferocytose. Cependant, dans les lésions athéromateuses avancées, l'efferocytose est altérée (Schrijvers et al., 2007; Cash et al., 2012), et les cellules spumeuses pro-apoptotiques deviennent

nécrotiques. L'accumulation de ces cellules est à l'origine de la formation du corps nécrotique (Tabas, 2010), composé de débris cellulaires, de dépôts de lipides et d'esters de cholestérol.

La formation de la chape fibreuse entourant le corps nécrotique dépend de la migration et de la prolifération des CML de la *media* vers l'*intima*, et de leur changement de phénotype.

En effet, sous l'influence de divers stimuli athérogènes, on observe un changement de phénotypes des CML qui passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (Doran et al., 2008; Lacolley et al., 2012). Ceci leur donne donc la capacité de proliférer et de migrer de la *media* vers l'*intima* pour participer à la formation de la chape fibreuse (Stegemann et al., 2005).
Cette transition de phénotype est régulée par de nombreux facteurs comme la thrombine, l'IFN-γ, le MCP-1 et le facteur de croissance PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Selzman et al., 2002; Spinetti et al., 2004; Rudijanto, 2007), produits par les différents types cellulaires qui constituent la paroi athéromateuse. Cette transition de phénotype est également modulée par les LDLox.
La production de facteurs de croissance, dont le PDGF et le TGF β (Tansfering Growth Factor β), libérés par les macrophages, les cellules endothéliales et les CML elles-mêmes, participent largement au signal de migration et de prolifération des CML vers l'*intima* (Stikorahm et al., 1992; Ross, 1993).
L'interaction entre CD40, exprimé par les macrophages et les lymphocytes T, et son ligand CD40L, semble également largement impliquée dans ce phénomène, qui permet la libération de cytokines inflammatoires influant sur la migration des CML (Schönbeck et al., 2000).
Les CML retrouvées dans l'*intima*, exprimant peu de protéines contractiles, ont un indice prolifératif élevé et une capacité accrue à synthétiser des molécules de la MEC, des protéases et des cytokines (Owens et al., 2004).

Ainsi, la migration, la prolifération et la synthèse de MEC par les CML induisent la formation d'une chape fibreuse qui recouvre le cœur lipidique de la plaque **(Figure 18)**.

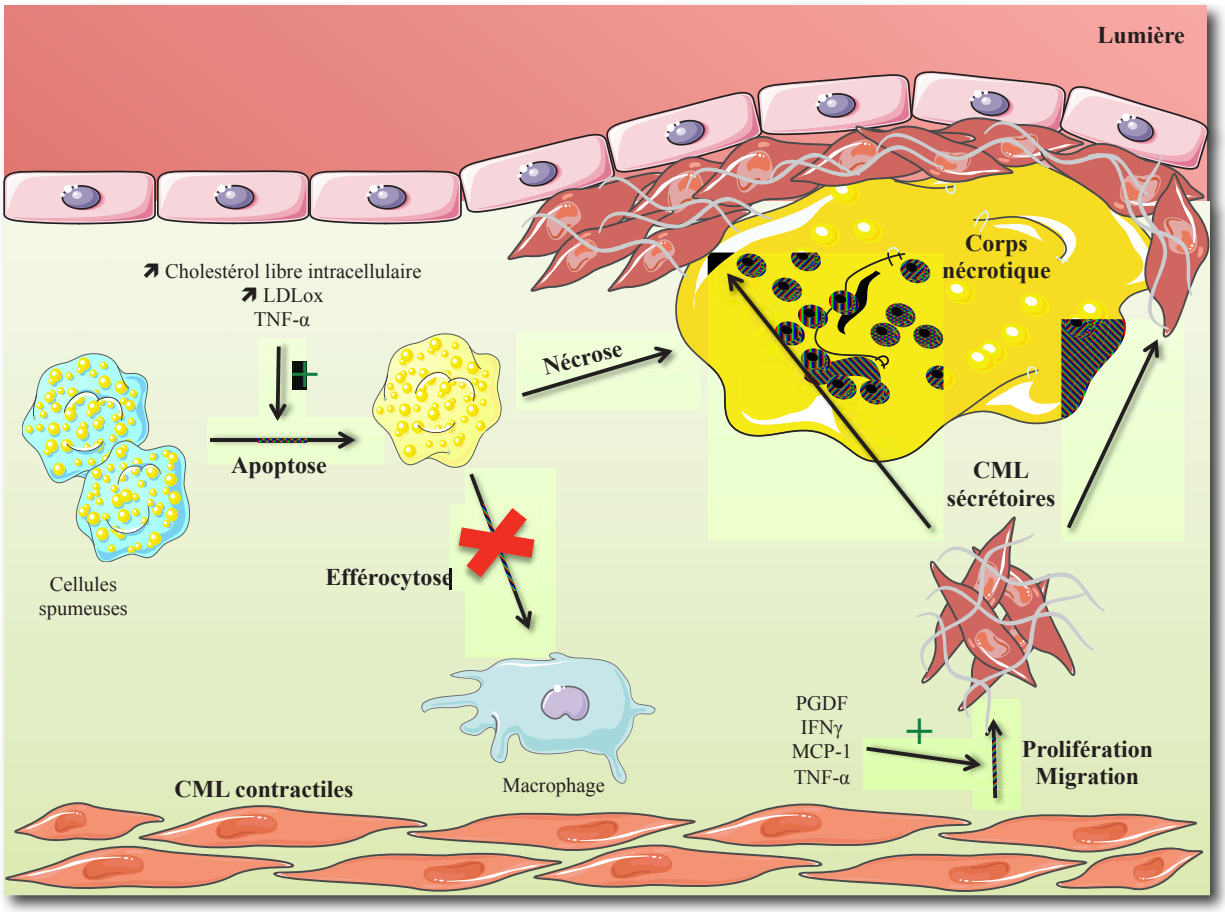


Figure 18 : *Formation du corps nécrotique et de la chape fibreuse*

D.4 Evolution de la lésion

La plaque athéromateuse se développe longtemps sans altérer le calibre vasculaire. De ce fait, le vaisseau s'adapte par un élargissement compensatoire appelé remodelage vasculaire excentrique. Néanmoins, lorsque la masse intimale dépasse 40 % de la surface totale de la paroi, le remodelage de celle-ci n'est plus suffisant pour contenir la plaque. Son développement se fait alors au détriment de la lumière artérielle et conduit à son obstruction progressive, ou sténose. L'évolution du corps nécrotique et de la chape fibreuse contribue à l'action sténosante des plaques.

Toutefois, la taille de la plaque n'est pas directement corrélée avec les manifestations graves de la maladie athéromateuse telles que l'infarctus, l'angor, la mort subite. Celles-ci dépendent essentiellement de la vulnérabilité de la plaque, c'est-à-dire son instabilité, qui augmente les risques de thrombose. Cette instabilité découle de différents facteurs comme la morphologie ou la composition de la plaque mais également de son degré d'inflammation.

En effet, une plaque stable est caractérisée par une chape fibreuse épaisse et un cœur lipidique peu important, le tout peu sensible à la rupture grâce principalement aux CML, qui synthétisent la MEC, et forment ainsi une chape fibreuse solide. A l'inverse, une plaque instable est caractérisée par une chape fibreuse mince (Finn et al., 2010) et un cœur lipidique/nécrotique important. Elle est susceptible de se rompre et de conduire à la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière artérielle en exposant le matériel lipidique thrombogène au contact du sang circulant.

L'amincissement de la chape fibreuse est le produit d'une augmentation de la dégradation de la MEC par l'activité de métalloprotéinases (MMP-1, MMP-2 et MMP-9) stimulées par les cytokines inflammatoires (Raffetto and Khalil, 2008), et d'une diminution de la synthèse du constituant majeur de la MEC : le collagène. Effectivement, l'IFN-γ sécrété par les lymphocytes T inhibe la production de collagène par les CML (Libby, 2008; Thim et al., 2008).

Par ailleurs, les cytokines pro-inflammatoires stimulent également l'apoptose des cellules vasculaires, augmentant la vulnérabilité et la thrombocité des plaques.

Ainsi l'inflammation semble jouer un rôle important pour induire l'instabilité de la plaque d'athérome.

Il est largement admis que l'événement initial entrainant la formation d'un thrombus au niveau de la plaque est soit la rupture (60 %), soit l'érosion (40 %) de la plaque pouvant entrainer une occlusion de l'artère.

La rupture de la chape fibreuse permet au sang circulant d'être en contact avec le cœur nécrotique thrombogène de la lésion athéromateuse, ce qui favorise la formation d'un thrombus **(Figure 19)**.

En effet, le cœur nécrotique est la partie la plus thrombogène de la plaque. Les LDLox, présentes dans le cœur nécrotique, activent directement les plaquettes et le facteur tissulaire, initiateur du processus de coagulation. Ce facteur tissulaire est capable de déclencher la cascade qui conduit à la formation de thrombine (Shah, 2007). Cette dernière induit la formation de fibrine à partir de fibrinogène et stabilise alors le thrombus. Au niveau de la plaque, le facteur tissulaire est exprimé par les macrophages, les cellules endothéliales, les CML et les cellules spumeuses.

L'érosion superficielle de la couche de cellules endothéliales peut être due à un autre mécanisme induisant la formation d'un thrombus. Cette érosion peut être la cause de la

présence de ROS au niveau de la plaque qui sensibilisent les cellules endothéliales à l'apoptose mais également de la présence des MMP qui dégradent la membrane basale des cellules endothéliales qui leur sert d'attachement à la paroi artérielle (Libby, 2008).

Souvent ce processus thrombotique peut être spontanément révolutif sans survenue de symptômes ischémiques. Généralement ces complications peuvent entrainer l'occlusion artérielle dont les principales manifestations sont l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux et les ischémies.

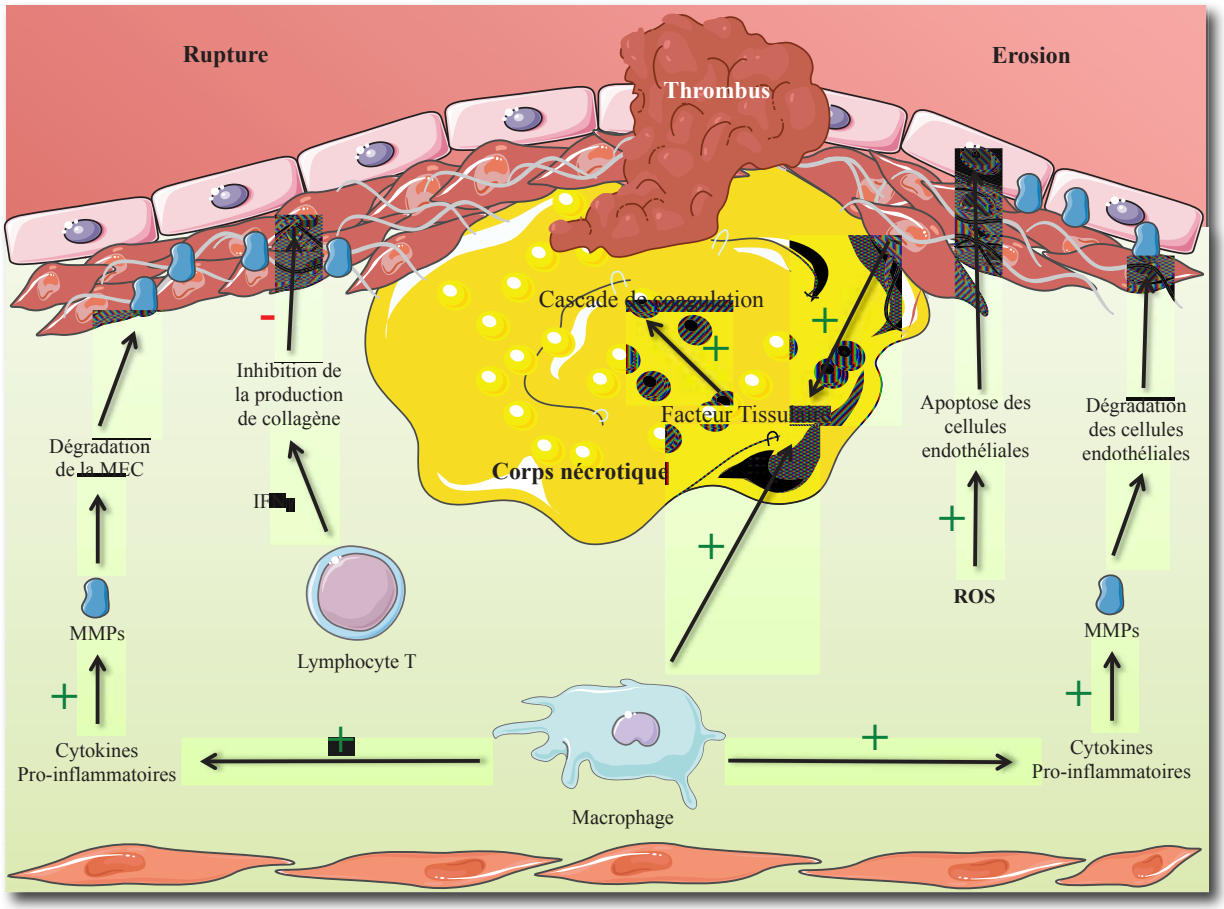


Figure 19 : *Evolution de lésion (formation d'un thrombus)*

E Facteurs de risque et protection des maladies cardiovasculaires

E.1 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Les MCV qui sont la première cause de mortalité en France, sont des pathologies multifactorielles. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence différents facteurs, avec notamment le suivi de la cohorte de Framingham (Kannel, 1976) (Massachussetts, USA), mis en place à la fin des années 40. Cette dernière est l'étude qui sert de base à la notion de facteurs de risque des MCV (Kannel and Wolf, 1992).

Ces facteurs de risque peuvent être classés en deux groupes distincts : les facteurs de risque non modifiables comme le sexe, l'âge et les facteurs génétiques, et les facteurs de risque modifiables, associant des caractères physiologiques à des paramètres physiques ou biologiques mesurables.

E.1.1 Facteurs de risque non modifiables

L'âge est le premier facteur de risque non modifiable mis en évidence dans le développement des pathologies cardiovasculaires. Plusieurs études, principalement celle de Framingham, ont montré une corrélation positive entre l'âge et l'apparition des MCV.
Cependant, il existe des différences entre les hommes et les femmes à propos de l'âge d'apparition de ces pathologies. En effet, l'incidence des MCV augmente nettement après 50 ans chez l'homme et après 60 ans chez la femme (Tunstall-pedoe et al., 1999).
Ce décalage d'apparition des MCV, serait dû aux hormones, essentiellement les œstrogènes, protégeant l'organisme des femmes jusqu'à la ménopause. De nombreuses études animales et cliniques (Adams et al., 1990; Grodstein et al., 1996) suggèrent que les œstrogènes moduleraient une multitude de voies moléculaires impliquées dans le développement de l'athérosclérose, afin de retarder son développement.
Les antécédents familiaux sont également un facteur de risque non négligeable. Le risque de développer une maladie cardiovasculaire augmente d'autant plus si un parent proche a présenté une pathologie cardiovasculaire à un âge précoce. La survenue d'un infarctus chez un parent augmente de trois fois le risque de maladie coronaire chez ses enfants (Seshadri et al., 2010).

E.1.2 Facteurs de risque modifiables

E.1.2.1 Dyslipidémie

Une dyslipidémie est caractérisée par une concentration anormale de lipides plasmatiques. Le lien entre hypercholestérolémie et MCV est clairement établi. En effet, de nombreuses études épidémiologiques à ce sujet, notamment l'étude Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) (Stamler et al., 2008), ont démontré une relation proportionnelle entre l'augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol et le risque de MCV. Toutefois, le cholestérol circulant n'a pas le même pouvoir athérogène selon les lipoprotéines qui le portent. Un taux plasmatique élevé de cholestérol-LDL (LDL-C) montre une forte corrélation avec le risque de développer une MCV. A l'opposé, le cholestérol-HDL (HDL-C) a un rôle protecteur de l'athérosclérose. Plusieurs études ont mis en évidence une relation inverse entre le taux de HDL-C et le risque de maladie coronaire (Assmann and Gotto, 2004).
L'hypertriglycéridémie est également un facteur de risque, reflet de l'alimentation mais prédisposant quand il est associé à une augmentation du LDL-C. Cependant, la relation entre TG et risque coronarien ne semble pas être directe mais dépendante de l'effet d'autres facteurs de risque (syndrome métabolique par exemple) qui s'accompagnent d'une élévation de la triglycéridémie.

E.1.2.2 Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) se définit par une élévation trop importante de la pression dans les artères, qui persiste au repos. Elle est caractérisée par une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg et une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg. L'HTA est largement corrélée avec le risque de MCV (Lloyd-Jones et al., 2009; Go et al., 2013) et aggrave l'athérosclérose (Chobanian, 1996). De plus, l'HTA est très souvent concomitante avec d'autres facteurs de risque tels que le diabète, l'obésité et les dyslipidémies.
En effet, l'HTA est liée à la dysfonction endothéliale (Park et al., 2001) et est susceptible de la promouvoir ou de l'aggraver. Par conséquence, ces effets mécaniques directs sur l'endothélium aboutissent à une augmentation de la perméabilité endothéliale et de ce fait à l'accumulation de LDL dans l'espace sous-intimal (Sun et al., 2007). L'HTA peut également

promouvoir l'inflammation en activant un facteur de transcription, NF-κB (Nuclear Factor Kappa B), permettant une augmentation de l'adhésion des monocytes à la paroi artérielle (Riou et al., 2007).

E.1.2.3 Tabagisme

Alors que les dégâts du tabagisme restent souvent associés à la survenue de cancers, il est important de ne pas négliger son influence sur le système cardiovasculaire. Le tabagisme est ainsi tenu pour responsable de 24 % des décès des MCV dans le monde. Les effets délétères du tabagisme sont corrélés de façon linéaire à la consommation de tabac et à la durée d'intoxication.

L'exposition à la fumée de cigarette active une myriade de mécanismes qui entrent en jeu dans l'athérogenèse. L'oxyde de carbone remplace l'oxygène transporté dans le sang et favorise le dépôt de cholestérol sur la paroi des artères.

La nicotine augmente la tension artérielle. Les composés oxydants, présents en grand nombre dans la fumée, participent aux mécanismes de dysfonction endothéliale, principalement par la mise en place d'un stress oxydant réduisant la biodisponibilité du NO (Peluffo et al., 2009). De plus, l'exposition permanente à la fumée résulte également en un état d'inflammation chronique (Gonçalves et al., 2011).

E.1.2.4 Régime alimentaire

C'est le facteur de risque comportemental le plus important après le tabac, dans le déterminisme coronaire. L'effet athérogène du régime alimentaire repose sur la modification de plusieurs facteurs de risque tels que les lipides, la glycémie, l'HTA, et est très intriqué à des facteurs de risque comme l'obésité. C'est la consommation d'acides gras saturés qui est athérogène car elle augmente le LDL-C et les TG (Mann, 2002). La consommation d'un repas riche en lipides provoque une dysfonction endothéliale passagère chez l'homme sain (Cuevas et al., 2000). Par ailleurs, il a été mis en évidence une augmentation importante des taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires, TNF-α et IL-6 (Interleukine 6), après ingestion d'un repas hyperlipidique riche en acides gras saturés (Nappo et al., 2002).

Le régime méditerranéen, pauvre en acides gras saturés et riche en acides gras insaturés, est associé à un risque cardiovasculaire le plus bas et à une espérance de vie la plus longue

(Corpet and Gerber, 1997; Khemayanto and Shi, 2014). De plus l'apport de vin rouge à doses modérées, dans l'alimentation a montré des effets protecteurs contre les MCV depuis de nombreuses années (Romain et al., 2012; Janega et al., 2014).

E.1.2.5 Diabète

Selon l'OMS, le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une augmentation de la glycémie.
Selon les critères actuels, le diabète est défini par une glycémie plasmatique à jeun supérieure à 1,26 g/L ou supérieure à 2 g/L en période postprandiale.
On distingue deux types de diabète, le diabète de type I dit insulino-dépendant (10 % des cas), et le diabète de type II non insulino-dépendant. Le diabète de type I se caractérise par une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques productrices d'insuline et donc par un déficit absolu en insuline. Le diabète de type II correspond à une résistance systémique à l'insuline entrainant une hypersécrétion compensatrice par les cellules β du pancréas. Cette hypersécrétion tend ensuite à diminuer puis disparaître après épuisement des cellules β, laissant place à une hyperglycémie chronique.

La maladie coronaire est la première cause de mortalité et de morbidité chez les patients diabétiques, avec un risque pouvant être multiplié par quatre par rapport aux non diabétiques (Beckman et al., 2002; Martín-Timón et al., 2014).
Les principaux dérèglements métaboliques liés au diabète, tels que l'insulino-résistance (IR), l'hyperglycémie, la dyslipidémie, l'HTA, potentialisent et accélèrent les différentes étapes de l'athérogenèse (Paneni et al., 2013).
Les plaques d'athérome des patients diabétiques contiennent des noyaux nécrotiques plus volumineux, une accumulation accrue de macrophages, de radicaux libres et de produits de glycation avancée (AGEs). De plus, l'endothélium et les monocytes circulants sont plus activés, ce qui provoque une augmentation plasmatique de LDL ainsi qu'une diminution de facteurs anticoagulants (Drouet et al., 2008). Le diabète peut accélérer le développement des lésions artérielles et favoriser leur déstabilisation en amplifiant chacune des étapes de l'athérogenèse (Ait-Oufella and Tedgui, 2008).

L'hyperglycémie empêche la production de NO en bloquant l'activation de la NO synthase endothéliale. De plus, elle augmente la production de ROS, principalement *via* l'activation de la protéine Kinase C (Geraldes and King, 2010) et du facteur de transcription NF-κB (Yerneni et al., 1999). Ce facteur régule l'expression de nombreux gènes codant pour les médiateurs inflammatoires (Goldin et al., 2006).

L'IR, caractéristique du diabète de type II, contribue également à la diminution de la réponse vasodilatatrice endothéliale. En effet, dans cette pathologie on retrouve une augmentation des ROS, et une diminution de la NOS entrainant une faible production en NO (Du et al., 2006).

La dysfonction endothéliale induite par le diabète est également caractérisée par une augmentation de la synthèse d'agents vasoconstricteurs, notamment l'ET-1et les prostanoïdes (Hink et al., 2001).

Enfin, l'agrégation plaquettaire et la thrombose sont favorisées en cas de diabète puisque l'hyperglycémie et l'IR tendent à altérer la fonction plaquettaire et les facteurs de coagulation plasmatiques (Hess and Grant, 2011).

E.1.2.6 Obésité et pathologies associées

E.1.2.6.1 Obésité

L'OMS définit l'obésité comme une accumulation anormale ou excessive de graisses corporelles qui représente un risque pour la santé. L'indice de masse corporelle (IMC = rapport poids (kg) / taille (m^2)) est un moyen simple et couramment utilisé pour mesurer l'obésité dans la population. Une personne présentant un IMC égal ou supérieur à 30 kg/m^2 est considérée comme étant obèse.

Indépendamment de l'IMC, il est maintenant admis l'importance de la localisation de l'excès de tissu adipeux dans le dépistage de l'obésité. En effet, l'obésité de type androïde (graisse située au niveau de la cavité abdominale) est beaucoup plus néfaste pour la santé que l'obésité gynoïde (graisse située au niveau des hanches et des cuisses) (Després, 2006). Les sujets obèses ont un risque deux à trois fois plus élevé qu'un sujet sain de développer une maladie coronarienne (Aldhahi and Hamdy, 2003).

L'obésité, notamment abdominale, a un effet délétère sur plusieurs voies métaboliques, menant ainsi au développement de diverses pathologies comme certains types de cancers,

certaines anomalies respiratoires, neurologiques mais plus particulièrement sur l'incidence des MCV et du diabète de type II (Hubert et al., 1983; Manson et al., 1990).
Cette relation entre obésité abdominale et MCV est principalement basée sur les fonctions endocrines et paracrines du tissu adipeux dans lequel sont produites un grand nombre de molécules, appelées adipokines. Ces dernières contribuent à la modulation de l'IR et au métabolisme énergétique, leur conférant des effets directs mais aussi indirects sur l'athérogenèse.

La première adipokine caractérisée, mais également la plus étudiée, est la leptine. Elle est produite par le gène *ob* et est presque exclusivement exprimée et produite au sein des adipocytes du tissu adipeux blanc (Zhang et al., 1994). Son niveau de concentration est directement corrélé avec la masse adipeuse corporelle et la taille des adipocytes (Houseknecht et al., 1998). Le principal effet de la leptine est de réduire la prise alimentaire et d'augmenter les dépenses énergétiques en agissant au niveau central, et plus spécifiquement au niveau de l'hypothalamus (Beltowski, 2006). Chez les individus obèses, la concentration en leptine plasmatique est corrélée positivement avec la masse adipeuse corporelle (Considine et al., 1996), ce qui résulte en une hyperleptinémie. Cette contradiction caractérise une désensibilisation à la leptine chez les individus obèses, nommée état de résistance à la leptine.
L'hyperleptinémie est généralement capable de promouvoir l'athérosclérose. En effet, la leptine joue un rôle important dans les premières étapes de l'athérogenèse en initiant le recrutement de monocytes par les cellules endothéliales qui déclenchent l'induction de ROS et l'expression de MCP-1 (Yamagishi et al., 2001). La leptine induit donc un stress oxydant en augmentant la formation de ROS, un médiateur clé de la dysfonction endothéliale (Bouloumie et al., 1999). Les ROS générées réduisent la biodisponibilité du NO en inactivant les eNOS, menant ainsi à une dysfonction endothéliale (Hare and Stamler, 2005).
Enfin, la leptine stimule la migration et la prolifération des CML vasculaires et leurs productions de métalloprotéinases (Beltowski, 2006). Elle possède également des effets pro-thrombotiques en augmentant l'agrégation plaquettaire (Anfossi et al., 2010). L'hyperleptinémie mène aussi à une augmentation de l'IR, un déséquilibre homéostasique et une inflammation vasculaire (Wannamethee et al., 2007).

L'adiponectine, une autre adipokine produite et sécrétée par le tissu adipeux blanc, possède des propriétés athéro-protectrices, contrairement à la leptine. Chez l'homme, les

concentrations plasmatiques d'adiponectine semblent être inversement liées à la résistance à l'insuline et à la gravité de la maladie coronarienne (Cesari et al., 2006).

Les effets athéro-protecteurs de cette hormone proviennent d'une part de ses effets métaboliques et de sensibilisation à l'insuline, et d'autre part de ses actions directes sur le cœur et le réseau vasculaire. Elle participe au maintien de l'homéostasie endothéliale, principalement *via* son effet activateur de la eNOS (Deng et al., 2010) et inhibiteur de ROS (Motoshima et al., 2004) mais également en réduisant l'apoptose des cellules endothéliales *via* la voie de signalisation AMPK (Ouchi et al., 2001). Des études ont démontré que des souris déficientes en adiponectine produisaient moins de NO, alors que l'administration d'adiponectine augmente la production de NO dans les cellules aortiques humaines (Ouchi et al., 2003; Ouedraogo et al., 2007). Elle possède également des propriétés anti-inflammatoires (Ouchi and Walsh, 2008) grâce à sa capacité à inhiber la voie de signalisation du NF-κB (Yamaguchi et al., 2005). Elle est aussi impliquée dans la diminution de la formation de cellules spumeuses (Tian et al., 2012). Enfin, l'adiponectine est capable de réduire la migration et la prolifération des CML vasculaires (Arita, 2002).

E.1.2.6.2 Syndrome Métabolique

L'obésité, surtout quand elle est abdominale, représente un facteur de risque majeur de nombreuses perturbations métaboliques rassemblées sous le terme de syndrome métabolique, concourant à l'augmentation du risque cardiovasculaire.

Le syndrome métabolique est caractérisé par un ensemble d'anomalies physiologiques et biochimiques, asymptomatiques, pouvant coexister avec des facteurs génétiques et acquis (Junquero et al., 2005).

Il existe plusieurs définitions du syndrome métabolique, mais à l'heure actuelle, seulement deux d'entre elles font office de références : celle de l'OMS (Alberti and Zimmet, 1998) et celle du NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III) (Anonym, 2001) **(Tableau 5)**.

Tableau 5 : *Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique (OMS et NCEP-ATP III)*

(Junquero et al., 2005)

Facteurs de risque	OMS (1998)	NCEP-ATP III (2001)
	Insulino-résitance et/ou anomalies de la régulation du glucose (glycémie à jeun, intolérance au glucose ou diabète) et 2 ou plus des facteurs de risque suivants :	Au moins 3 des facteurs de risque suivants :
Hypertension	TA ≥ 140/90 mmHg	TA ≥ 130/85 mmHg
Dyslipidémie	TG ≥ 1,5 g/L et/ou HDL-C < 0,35 g/L Homme < 0,39 g/L Femme	TG ≥ 1,5 g/L et/ou HDL-C < 0,4 g/L Homme < 0,5 g/L Femme
Obésité viscérale ou centrale	Rapport taille / hanches > 0,9 Homme > 0,8 Femme et/ou IMC > 30 kg/m²	Tour de taille > 102 cm Homme > 88 cm Femme
Autres	Microalbuminurie	Glycémie à jeun ≥ 1,1 g/L

Plusieurs études ont montré que le syndrome métabolique est associé à un risque deux fois plus élevé de troubles cardiovasculaires (Alexander et al., 2003; Dekker et al., 2005; Mottillo et al., 2010).

L'obésité abdominale et l'IR occupent une place prépondérante dans le développement de cette pathologie.

E.1.2.6.3 Foie stéatosé non alcoolique

La maladie du foie stéatosé non alcoolique (NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) est une manifestation hépatique du syndrome métabolique. En effet, il a été démontré que deux éléments clés du syndrome métabolique, l'obésité et la résistance à l'insuline, sont étroitement associés au développement des NAFLD (Bugianesi et al., 2005; Parekh and Anania, 2007; Kotronen and Yki-Järvinen, 2008; Smith and Adams, 2011). La NAFLD est caractérisée par une accumulation de vacuoles lipidiques (TG) dans le cytoplasme des hépatocytes. Un foie est considéré comme stéatosé quand au moins 5 à 10 % des hépatocytes sont infiltrés, et ce, en l'absence d'une consommation excessive d'alcool.

La NAFLD est généralement considérée comme une lésion bénigne, mais elle peut constituer la première étape d'une simple stéatose hépatique isolée vers une stéatose beaucoup plus sévère, caractérisée par des lésions hépato-cellulaires, une inflammation chronique et une fibrose. Dans ce cas, on parle de stéato-hépatite ou NASH (Non-Alcoholic Steato-Hepatitis) (Leclercq and Sempoux, 2006). Les lésions peuvent finalement se compliquer en cirrhose et présenter un risque accru de carcinome hépatocellulaire **(Figure 20)**.

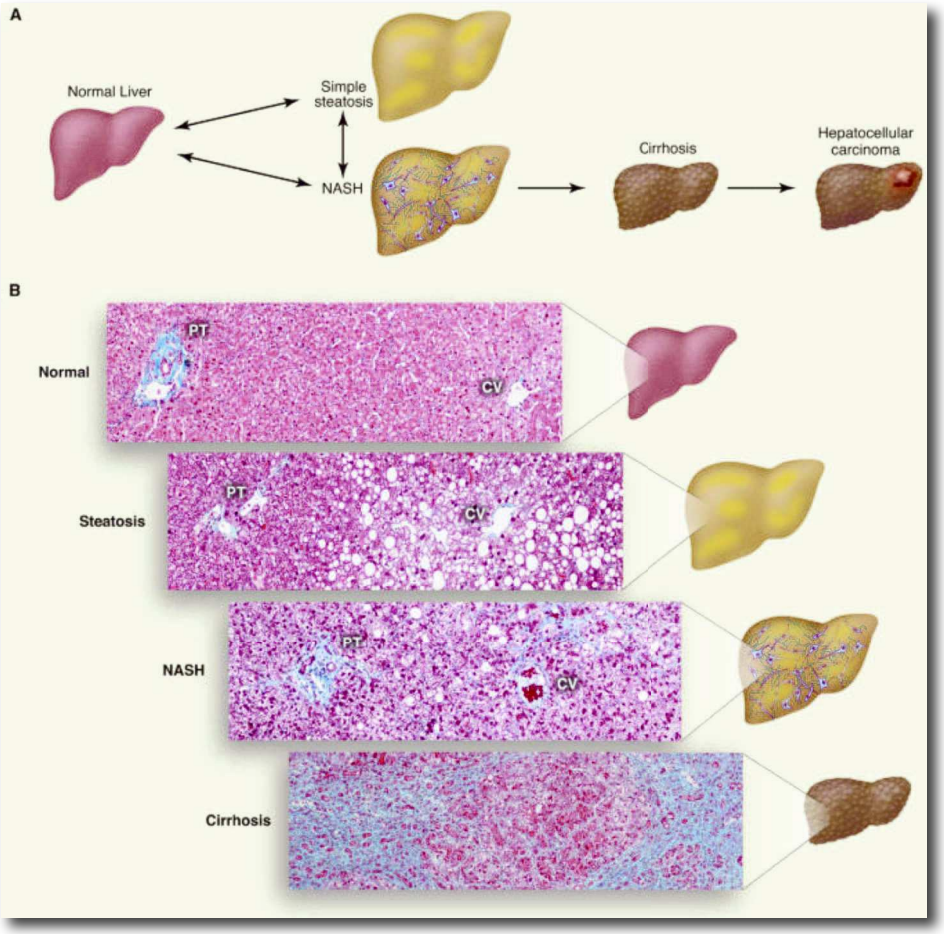


Figure 20 : *Développement et histologie de la NAFLD* (Cohen et al., 2011)

Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le développement de la stéatose hépatique vers la NASH (Loria et al., 2007) :

- activation des voies inflammatoires
- résistance à l'insuline
- dysfonction mitochondriale
- stress oxydant et peroxydation lipidique
- altération du métabolisme lipidique
- augmentation de la vulnérabilité des hépatocytes conduisant à l'apoptose

La pathogenèse de la NAFLD est basée sur l'hypothèse des « two hits » proposé par Day & James (Day and James, 1998) qui a récemment été réactualisée comme une hypothèse « multi hits » (Lewis and Mohanty, 2010) : le « first hit » correspond à la stéatose hépatique simple qui mène aux « multi hits » conduisant à la NASH.

Le « first hit » est la conséquence d'un déséquilibre entre la voie de synthèse et de dégradation des TG. L'accumulation de ces derniers dans le foie peut trouver son origine dans différentes régulations qui peuvent coexister :

- Augmentation de l'apport en acides gras libres (AGL) hépatiques issus de l'alimentation, de la lipolyse accrue du tissu adipeux, ou de la synthèse hépatique *de novo*.
- Augmentation de la synthèse de TG hépatiques
- Diminution de la synthèse et de la sécrétion des VLDL
- Diminution de la β-oxydation

Il a été suggéré que l'IR serait à l'origine de la pathogenèse, initiateur du « first hit ». En effet, à l'état d'IR, les cellules adipeuses et musculaires oxydent préférentiellement les lipides. Cela entraine la libération d'AGL, qui seront incorporés dans le foie, amenant à la stéatose (Lewis and Mohanty, 2010).

La raison pour laquelle certains patients passent du « first hit » aux « multi hits » et progressent ainsi, de la stéatose simple à la NASH, ne semble pas totalement élucidée. Mais elle semblerait impliquer une vulnérabilité accrue des hépatocytes stéatosiques au stress oxydant et au développement de l'inflammation.

Les patients ayant une NASH ont des taux plus élevés de facteur de transcription NF-κB, facteur pro-inflammatoire (Videla et al., 2009). De plus, une cytokine pro-inflammatoire, la TNF-α, semble être impliquée dans la pathogenèse stéatosique. Les concentrations de TNF-α sont corrélées à la sévérité de l'inflammation et de la fibrose (Crespo et al., 2001; Abiru et al., 2006).

L'adiponectine joue un rôle important dans la régulation des acides gras en inhibant la gluconéogenèse hépatique (Yamauchi et al., 2002). Les taux bas d'adiponectine semblent être associés à une inflammation hépatique plus sévère (Targher and Arcaro, 2007), tandis que l'administration d'adiponectine améliore l'inflammation et la stéatose dans les modèles animaux (Xu et al., 2003).

L'excès d'AGL favorise la β-oxydation mitochondriale, induisant l'augmentation de l'activité du cytochrome P4502E1 (Leung and Nieto, 2013). Ce dernier conduit à une hausse de la production de ROS et de ce fait à une augmentation de la peroxydation lipidique qui favorise l'inflammation et la fibrose.

La dysfonction mitochondriale observée chez les patients ayant une NASH (Pérez - Carreras et al., 2003), contribue à l'accroissement du stress oxydant (Wei et al., 2008).

La production accrue de ROS et des produits de la peroxydation lipidique augmente la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, *via* principalement la voie de signalisation du NF-κB, renforçant de son côté la production de ROS, mettant ainsi en place une boucle d'amplification **(Figure 21)**.

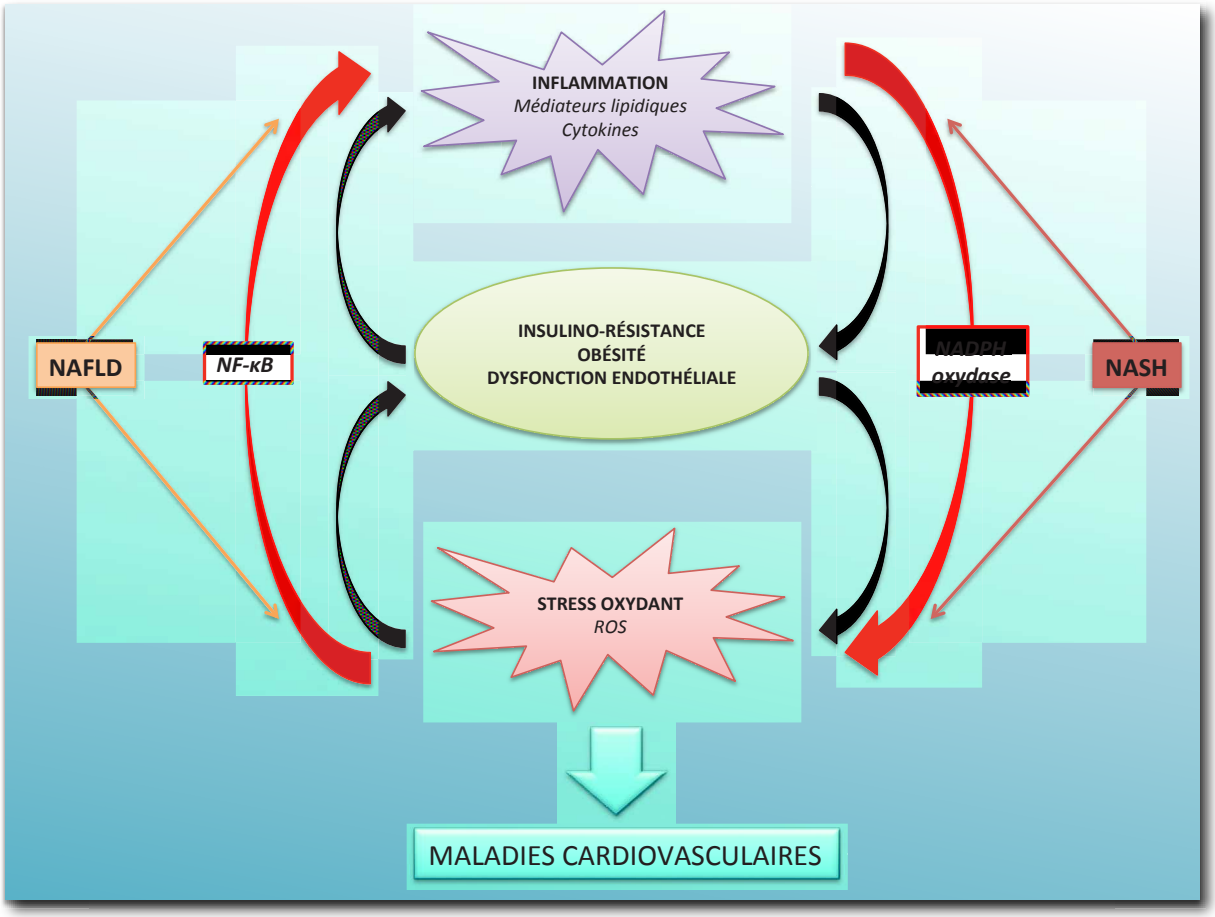


Figure 21 : *Boucle d'amplification entre le stress oxydant et l'inflammation*

Enfin, il semblerait que la composition du régime alimentaire, et plus particulièrement en lipides, pourrait directement influencer le contenu en lipides du foie (Aoun et al., 2012). En effet à terme, cela induirait l'apparition d'une stéatose hépatique plus rapidement (Lieber et al., 2004).

E.2 Protection des maladies cardiovasculaires

E.2.1 Rôle athéro-protecteur des HDL

De nombreuses études ont démontré une corrélation négative entre le développement des MCV, notamment l'athérosclérose, et la concentration plasmatique en HDL (Assmann et al., 1996; Sharrett et al., 2001).

Un grand nombre de preuves a émergé des études animales suggérant que l'élévation de HDL-C dans le sang est protectrice. Badimon et son équipe (Badimon et al., 1989, 1990) ont été les premiers à mettre en évidence que l'administration de HDL-C inhibe la formation de la lésion athéromateuse et permet la régression de cette lésion chez le lapin. Depuis ce temps, de nombreuses études sur différents modèles animaux ont établi qu'une augmentation plasmatique de la concentration en HDL a un impact bénéfique sur la lésion athéromateuse (Shah et al., 1998) mais également sur les composantes lipidiques et inflammatoires (Shah et al., 2001).

L'athéro-protection induite par les HDL a été attribuée à leur rôle majeur dans le transport inverse du cholestérol (Florentin et al., 2008), qui est le processus physiologique par lequel le cholestérol excédentaire présent dans les tissus périphériques est capté puis transporté au niveau du foie, organe principal de dégradation et d'excrétion du cholestérol.

Les particules de HDL permettent la fuite du cholestérol des cellules *via* de nombreux mécanismes grâce à la diffusion passive et aux récepteurs scavengers de classe B, type I (SRBI). De plus, des transporteurs actifs de la famille ABC, ABCA1 et ABCG1, participent activement à cette fuite du cholestérol vers les HDL (Favari et al., 2009; Rothblat and Phillips, 2011).

D'autres fonctions des HDL participent également à cet effet athéro-protecteur telles que leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et leurs effets protecteurs sur l'endothélium **(Figure 22)**.

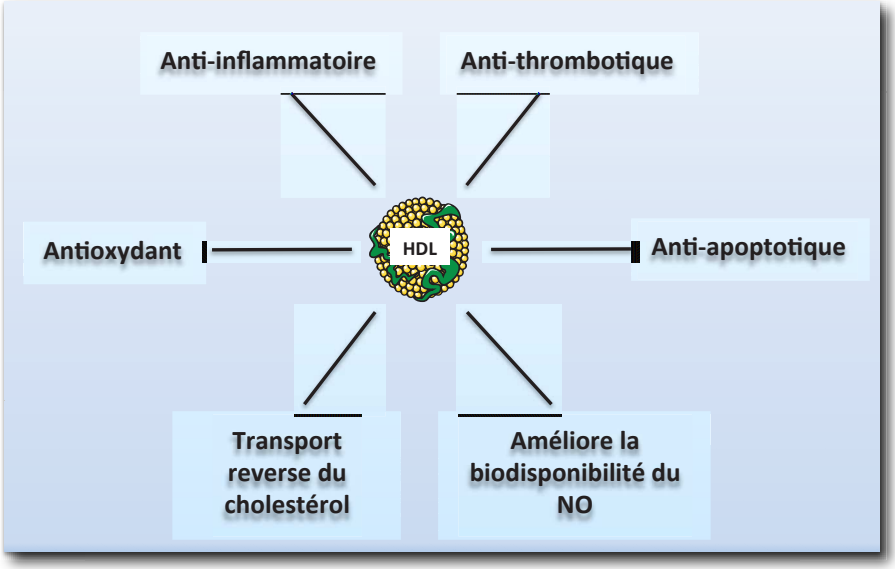


Figure 22 : *Propriétés fonctionnelles athéro-protectrices des HDL* (Eren et al., 2013)

Les propriétés antioxydantes des HDL passent par la capacité à inhiber les modifications oxydatives subies par les LDL (Navab et al., 2000). Cette propriété serait majoritairement due à l'activité de composés présents sur les HDL (Mackness et al., 2000) tels que l'ApoA1, la PAF-AH (Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase) et plus particulièrement la paraoxonase 1 (PON-1). Cette dernière est une estérase capable d'hydrolyser les lipides oxydés, diminuant ainsi l'oxydation des LDL et par conséquent le pouvoir athérogène de ces particules (Aviram and Vaya, 2013).

Les HDL possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, en inhibant l'expression de molécules d'adhésion et des chimiokines pro-inflammatoires exprimées par les cellules endothéliales, évènements clés dans le développement de l'athérosclérose (Baker et al., 1999; Barter et al., 2002).

De plus, les HDL ont la capacité d'inhiber la sécrétion de MCP-1, action qui serait attribuée à la PON-1. En effet, une étude *in vitro* a montré que des HDL dépourvues de PON-1 ne sont plus capables d'inhiber la production de MCP-1 induite par les LDLox (Mackness et al., 2004).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que les HDL peuvent contribuer à préserver l'homéostasie en promouvant la vasorelaxation (Calabresi et al., 2003). Les HDL peuvent moduler le tonus vasculaire en induisant la synthèse de molécules, principalement le NO. Les HDL sont capables d'induire l'expression et l'activation de la eNOS (Kuvin et al., 2002; Mineo et al., 2006). Cette production confère aux HDL des propriétés anti-

thrombotiques (Soran et al., 2012), le tout contribuant à un effet anti-athéromateux **(Figure 23)**.

De plus, les HDL ont la capacité d'induire la production de cytokines anti-inflammatoires, TGF-β2 (Transforming Growth Factor β2) (Norata et al., 2005), limitant ainsi le développement de l'athérosclérose.

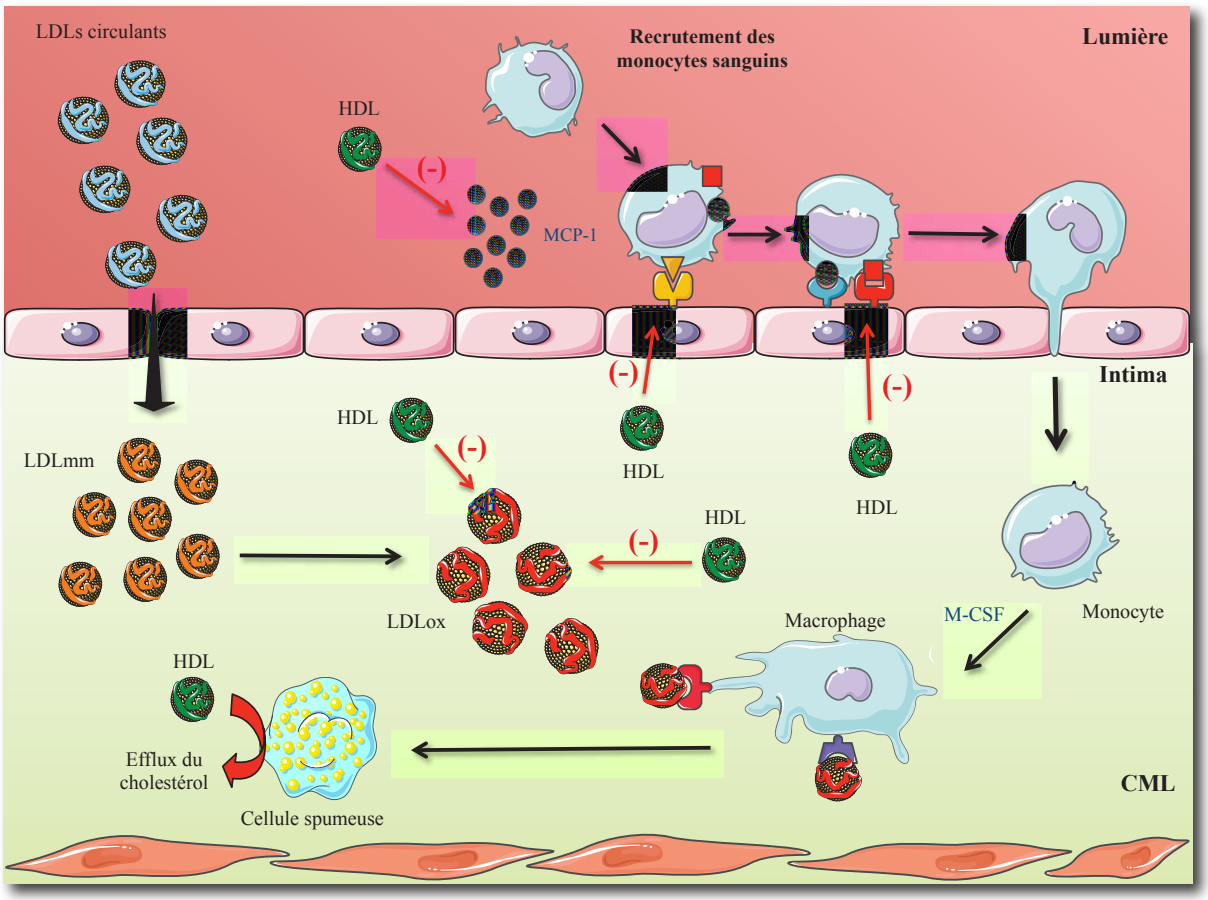


Figure 23 : *Rôle athéro-protecteur des HDL*

E.2.2 Mécanismes antioxydants : Défenses enzymatiques

Les cellules ont développé des systèmes enzymatiques complexes assurant une protection vis-à-vis des effets délétères du stress oxydant, permettant ainsi de lutter contre le développement de l'athérosclérose.

Un antioxydant se définit comme toute substance, présente en faible quantité par rapport à un substrat oxydable, capable de réduire ou de retarder de manière significative l'oxydation de celle-ci.

Les enzymes antioxydantes représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaire contre les attaques oxydatives. Les enzymes impliquées agissent en synergie pour lutter contre les ROS **(Figure 24)**.

E.2.2.1 Superoxyde Dismutase

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes catalysant la dismutation de l'$O_2^{\circ-}$ en H_2O_2. Elles représentent donc la première ligne de protection contre les ROS. En fonction du cofacteur associé à la SOD, on distingue plusieurs isoformes dans la cellule et dans le milieu extracellulaire. La SOD à cuivre et zinc (CuZn-SOD ou SOD1) est la forme la plus abondante dans le cytoplasme (Crapo et al., 1992), la SOD à manganèse (Mn-SOD ou SOD2) est localisée dans les mitochondries (Weisiger and Fridovich, 1973), et la SOD3 (ou EC-SOD) représente la forme extracellulaire (Marklund, 1982) de l'enzyme SOD.

E.2.2.2 Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme tétramérique qui catalyse la réduction du H_2O_2, produit par la SOD, en O_2 et H_2O. C'est une enzyme ubiquitaire, fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. A l'exception de ces dernières, l'activité de la catalase est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (Catapano, 1997).

E.2.2.3 Glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases (GPx) réduisent également H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, en alcools en utilisant la capacité réductrice du couple glutathion réduit / oxydé (GSH / GSSG). Il existe plusieurs isoformes de la GPx portant un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine au niveau du site actif. Toutes les GPx catalysent le même type de réaction mais elles diffèrent par leurs substrats, leurs rôles et leurs localisations.

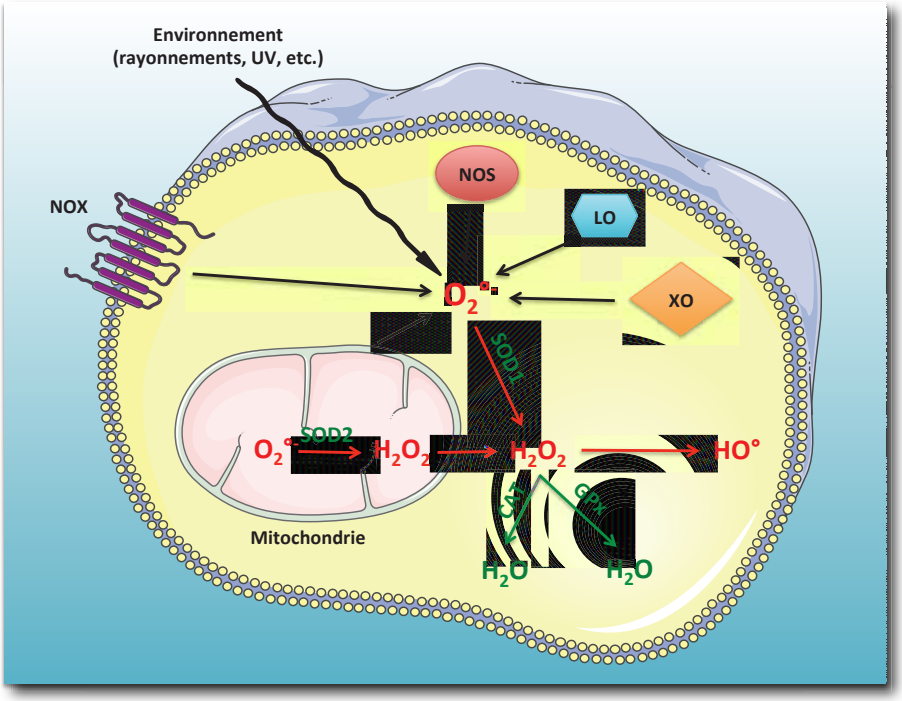


Figure 24 : *Principaux systèmes oxydants et antioxydants endogènes (NOX : NADPH oxydase ; NOS : NO synthase ; LO : lipoxygénase ; XO : Xanthine oxydase ; SOD : Superoxyde Dismutase ; GPx : Glutathion Peroxydase ; CAT : Catalase)* (Sugamura and Keaney, 2011)

E.2.3 Mécanismes antioxydants : défenses non enzymatiques

Différentes molécules de faibles poids moléculaires, liposolubles ou hydrosolubles, possédant souvent un groupement thiol, contribuent à la complémentarité des défenses antioxydantes de l'organisme. Les antioxydants non enzymatiques sont des composés principalement apportés à l'organisme par l'alimentation.

E.2.3.1 Vitamine E

Le terme vitamine E regroupe deux familles d'isomères, les tocotriénols et les tocophérols. La différence entre ces deux familles se joue sur le degré d'insaturation de la chaine latérale.
La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble pouvant réduire les radicaux peroxyls et réagir avec $O_2^{\bullet-}$, HOCl et $ONOO^-$ (Frei and Ames, 1992). Chez l'homme, l'α-tocophérol est la forme la plus active. En raison de sa nature liposoluble, la vitamine E peut s'insérer au niveau des membranes et empêcher la propagation de la peroxydation lipidique.

De nombreuses études ont montré une association entre la consommation de vitamine E et une diminution de l'oxydation des LDL, une réduction du risque d'athérosclérose et des maladies coronariennes (Rimm et al., 1993; Stampfer et al., 1993).

E.2.3.2 Vitamine C

La vitamine C (ou acide ascorbique) est l'antioxydant plasmatique hydrosoluble le plus puissant. Elle est capable, d'une part, de céder facilement des électrons à quasi tous les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyl, radical peroxyl) et d'autre part, de participer à la régénération de la vitamine E afin de prévenir la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques (Miller and Aust, 1989). De plus, il a été montré que la vitamine C peut augmenter la synthèse de NO *via* l'interaction avec BH_3 (Borane). Elle peut donc régénérer BH_4 à partir de BH_3, prévenant ainsi le découplage d'eNOS (Huang et al., 2000; Heller et al., 2001).

E.2.3.3 Acide urique

L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines, issu de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, réaction catalysée par la xanthine oxydase et la déshydrogénase. L'acide urique à la capacité de piéger directement les ROS. La réaction de l'acide urique avec les oxydants entraine la formation du radical urate, qui peut être alors réduit par l'ascorbate (Stocker and Keaney, 2004).

E.2.3.4 Bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine, un puissant agent réducteur et un potentiel antioxydant physiologique. La bilirubine, sous forme libre ou liée à l'albumine, à la capacité de réduire la vitamine E et ainsi d'inhiber la peroxydation lipidique (Neuzil and Stocker, 1994).

Une étude a montré que des patients porteurs du syndrome de Gilbert (hyperbilirubinémie) ont moins de risque d'avoir des MCV, grâce aux propriétés antioxydantes de la bilirubine

(Vítek et al., 2002). Inversement, un taux bas de bilirubine est corrélé à un risque plus important de survenue de MCV (Horsfall et al., 2012).

E.2.3.5 Groupements thiols

Le glutathion est considéré comme la plus abondante des molécules intracellulaires ayant un groupement thiol. Sous forme réduite, le GSH (Glutathion) agit comme antioxydant, (i) en tant que trappe radicalaire (c'est un piégeur de radicaux hydroxyles) ; (ii) en tant que cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes ; (iii) en participant à la détoxification des lipides peroxydés ; (iv) en régénérant l'α-tocophérol et l'acide ascorbique sous leur forme active.

L'albumine, protéine circulante la plus abondante, possède de nombreux groupements thiols, lui permettant, tout comme le GSH, de jouer le rôle de trappe radicalaire.

D'autres antioxydants issus de l'alimentation sont également impliqués dans les défenses contre les attaques oxydatives : on retrouve les oligoéléments (cuivre, fer, sélénium, etc.), l'ubiquinone (Coenzyme Q10), les caroténoïdes, les polyphénols mais également des complexes protéiques des spirulines dont les actions seront détaillées dans la partie II.

Partie II - Arthrospira platensis, une cyanobactérie

A Généralités

A.1 Cyanobactérie

Les cyanobactéries appartiennent au domaine des bactéries Gram négatif, bactéries qui sont dépourvues de noyau. A l'instar des algues et des plantes, ce sont les seuls procaryotes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique, c'est-à-dire qu'elles utilisent la lumière comme source d'énergie. Du fait qu'elles utilisent l'eau comme donneur d'électrons, les cyanobactéries se distinguent nettement des autres bactéries synthétiques, telles que les bactéries pourpres ou vertes, qui, elles, utilisent le sulfure d'hydrogène comme donneur d'électrons.

Des traces fossiles des cyanobactéries, datant d'environ 3,5 milliards d'années, ont été retrouvées et auraient probablement joué un rôle important dans la formation de l'oxygène atmosphérique (Tamagnini et al., 2007; Parmar et al., 2011), qui a soutenu l'évolution des formes de vie existantes actuelles.

Les cyanobactéries sont caractérisées par la présence d'un certain nombre de pigments, tels la chlorophylle, les caroténoïdes, la phycoérythrine, la phycocyanine et l'allophycocyanine, leur conférant de ce fait diverses couleurs.

Les cyanobactéries sont omniprésentes sur Terre. On les retrouve essentiellement dans les habitats marins et d'eau douce mais elles sont en mesure de survivre dans presque tous les milieux. Elles constituent donc un groupe génétiquement et morphologiquement très hétérogène. Elles peuvent être unicellulaires ou filamenteuses, soit isolées, soit regroupées en colonies.

Elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques de l'azote, du carbone et de l'oxygène. Par exemple, elles peuvent agir comme un biofertilisant naturel grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Rastogi et al., 2014).

Les cyanobactéries sont une immense source de divers produits naturels ayant une valeur médicinale, industrielle et agricole. Elles sont également utilisées comme une source alternative de produits chimiques naturels dans les cosmétiques synthétiques et comme ressources énergétiques conventionnelles (Whitton and Potts, 2000). L'utilisation de certaines espèces de cyanobactéries comme source non conventionnelle de nourriture et de protéines est prometteur (Vaishampayan et al., 2001).

A.2 Spiruline

A.2.1 Histoire

La spiruline, appartenant à la famille des cyanobactéries, fut découverte par le monde occidental au milieu du XXe siècle. A la fin des années 1930, au cours d'un voyage au Tchad, le professeur Créac'h de Bordeaux, découvrit sur un marché local des galettes séchées de couleurs vertes-bleuâtres, appelées « dihé ». Le phycologiste français Dangeard examina ces galettes dès 1940 et constata que celles-ci étaient composées d'une algue bleue (Dangeard, 1940). Malheureusement la seconde guerre mondiale a entravé ces observations et ces découvertes sont passées inaperçues.

Ce n'est seulement que vers les années 1960 que la spiruline réapparut. Lors d'une expédition au Tchad, le botaniste belge Jean Léonard remarqua lui aussi les fameuses galettes bleue-vertes. Celles-ci furent confiées à un autre botaniste, P. Compère, lequel identifia et analysa la substance présente dans ces galettes : la spiruline, trésor de protéines, vitamines, minéraux, enzymes et pigments…(Léonard and Compère, 1967).
Ce dernier a en effet constaté que le peuple des Kanembous écumait la surface des mares riches en carbonate de sodium, aux environs du lac Tchad, à la recherche de la fameuse algue abondante sur ce lac et récoltée sous forme de purée bleue-verte. Cette mixture était ensuite utilisée dans la préparation de galettes (dihé) vendues dans la région (Girardin-Andréani,

2005). Par la suite, plusieurs recherches ont démontré que cette algue était déjà connue pour ses bienfaits.

En effet, elle est non seulement consommée depuis des nombreuses générations en Afrique, mais on a également constaté, en relisant certaines chroniques de la conquête espagnole décrivant la vie des Aztèques, que ces derniers la consommaient déjà à cette époque. Le conquistador espagnol Cortès rapporte dans ses mémoires cette curieuse habitude qu'avaient les indiens de promener à la surface des lacs des filets très serrés, pour récolter une sorte de boue verdâtre, qu'ils faisaient sécher au soleil, pour la transformer et s'en servir. Cette galette, nommée « tecuitlatl » par les Aztèques, constituaient leur aliment de base (Farrar, 1966; Paniagua-Michel et al., 1993). Ainsi, les Aztèques récoltaient la spiruline de la même manière que le peuple Kanembou pour s'alimenter.

Cependant, la récolte de la spiruline s'effondra en même temps que l'empire Aztèque et ne fut redécouverte en ce lieu, que quatre siècles plus tard, de façon inattendue. En effet, dans les années 1970, au Mexique, la société Sosa Texcoco exploitait les eaux alcalines souterraines du lac Texcoco. L'extraction du carbonate de sodium était perturbée par une minuscule algue qui obstruait le système, la spiruline. Après son identification, la société se mit à récolter la spiruline, appelée l'or vert. Ce fut la première culture commerciale mondiale.

L'aventure continua par l'implantation de fermes géantes pour une production mondiale et par l'installation de fermes artisanales dans les pays du tiers-monde pour lutter contre la famine.

Grâce à sa composition remarquable permettant maintes applications utiles, la spiruline devient un bon moyen pour lutter contre la malnutrition dans ces pays défavorisés. Dans nos pays, cette algue est devenue un point de mire en diététique.

Depuis, de nombreuses recherches ont émergé, suggérant une multitude d'applications possibles de la spiruline, notamment dans le domaine médical.

A.2.2 Taxonomie

Les spirulines, appartenant à la famille des cyanobactéries font partie des plus anciennes formes de vie photosynthétique apparue sur Terre. Bien que communément appelée spiruline (nom commercial dû à sa forme enroulée en spires), cette cyanobactérie filamenteuse appartient au genre *Arthrospira* (Wheeler et al., 2000; Boone et al., 2001). Les algues appartenant à ce genre sont comestibles, contrairement aux algues appartenant au genre *Spirulina*. Dans le genre *Arthrospira*, on retrouve deux espèces principales, *Arthrospira platensis*, originaire d'Afrique, et *Arthrospira maxima*, originaire d'Amérique centrale.

Dans notre étude, l'espèce utilisée est l'espèce *platensis*, dont la taxonomie est représentée dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : *Taxonomie de l'espèce Spirulina platensis*

Règne	*Monera* ou *Bacteria*
Sous-règne	*Prokaryota*
Phylum ou Division	*Cyanophyta* ou *Cyanobacteria*
Classe	*Cyanophyceae*
Ordre	*Oscillatoriales*
Famille	*Oscillatoriaceae*
Genre	*Arthrospira*
Espèce	*platensis*

A.2.3 Morphologie

La spiruline est constitué de cellules transparentes empilées bout à bout formant ainsi un filament ou trichrome. L'enroulement du trichrome sur lui-même s'effectue suivant le sens des aiguilles d'une montre lorsqu'on regarde au dessus de la spirale **(Figure 25)**. Un facteur environnemental, tel que la température, aurait cependant une influence sur l'orientation de l'hélice (Mühling et al., 2003). Cette morphologie typique lui permet de se déplacer dans l'eau.

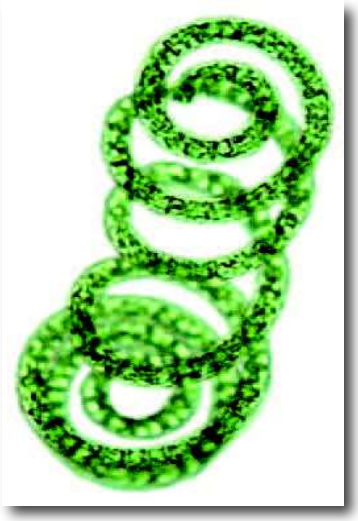


Figure 25 : *Morphologie de la spiruline* (source : www.spiru.fr)

La spiruline a une longueur moyenne d'environ 250 µm, composée de filaments mobiles de 10 à 12 µm de diamètre non ramifiés et enroulés en spirale, généralement en 6 ou 7 spires (Fox, 1999). Cette forme hélicoïdale qui lui donne l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation de spiruline.

A.2.4 Répartition géographique

La spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes et riches en nutriments azotés et phosphorés. On la retrouve communément dans des eaux saumâtres, ainsi que dans des lacs salins des régions tropicales et semi-tropicales (Castenholz et al., 2001). Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. Ainsi, elle est retrouvée à l'état naturel dans les lacs salins en Afrique, en Amérique latine et en Asie du Sud.

A.2.5 Intérêts

Les spirulines sont reconnues pour être très intéressantes pour l'homme grâce à leurs propriétés nutritionnelles établies depuis des milliers d'années.
C'est au cours d'analyses approfondies sur les spirulines que beaucoup de points particulièrement novateurs sur le plan nutritionnel sont apparus. C'est d'abord

l'impressionnante teneur en protéines des spirulines qui a attiré l'attention des chercheurs et des industriels.

En effet, elles sont riches en protéines (~ 60-70%) hautement digestibles (ou assimilables), contenant tous les acides aminés essentiels et non essentiels. Cette microalgue ne possède pas de paroi cellulosique mais une enveloppe relativement fragile, constituée de polysaccharides. Cette faible teneur en cellulose explique sa haute digestibilité (Costa et al., 2002). On retrouve également la présence de lipides essentiels rares, de nombreux minéraux et vitamines.

Disponible commercialement pour la consommation depuis des décennies et considérée comme un aliment propice à la santé, de nombreuses études ont montré que la spiruline n'a aucun effet toxique et ne relâche aucune toxine (Chamorro et al., 1988, 1996; Salazar et al., 1998; Hutadilok-Towatana et al., 2008, 2010). De ce fait, les spirulines font partie des rares algues qui sont comestibles et qui bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché.

De plus, la technique de culture, considérée comme relativement facile, permet une production massive à grande échelle.

De ce fait, grâce à ses propriétés nutritionnelles très intéressantes, la spiruline peut être un élément clé pour combattre la malnutrition.

Parallèlement à sa qualité nutritionnelle, elle possède des effets bénéfiques pour la santé grâce à diverses propriétés, telles que des effets antioxydants, hypolipidémiants et anti-inflammatoires (Cheong et al., 2010; Deng and Chow, 2010).

De plus, elle a également la propriété d'absorber et d'accumuler facilement des oligoéléments qui sont ensuite métabolisés et peuvent être incorporés dans les molécules organiques (protéines, polysaccharides, etc.). En effet, des études ont montré que la spiruline est capable d'incorporer des oligoéléments, comme le sélénium par exemple, et de le rendre hautement biodisponible (Cases et al., 2001, 2002; Riss et al., 2007; Zhang et al., 2011).

B Composition spiruline

Même s'il a été établi que les variations de conditions de culture provoquent des changements dans la composition biochimique de la spiruline, cela n'affecte pas ses qualités nutritionnelles. En effet, en moyenne, la spiruline contient en pourcentage de son poids sec environ 65 à 70 % de protéines, 15 à 25 % de glucides, 6 à 8 % de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux (essentiellement des oligoéléments), et des pigments (chlorophylle, caroténoïdes et phycobiliprotéines) (Falquet, 1997; Cheong et al., 2010) **(Figure 26)**.

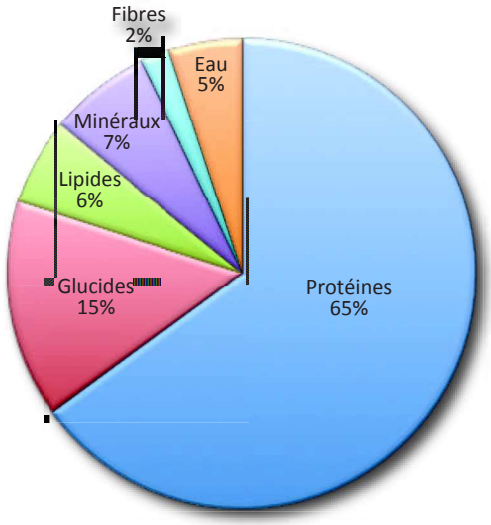


Figure 26 : *Composition de la spiruline en pourcentage de son poids sec*

B.1 Protéines

La teneur en protéines de la spiruline est élevée, et représente environ 60 à 70 % de la matière sèche. Ce pourcentage est deux à trois fois plus élevé que celui de la viande, du poisson ou de soja. Le spectre des acides aminés montre que la valeur biologique des protéines de la spiruline est très élevée. D'un point de vue qualitatif, les protéines de la spiruline sont complètes, car tous les acides aminés essentiels y figurent, et dans de généreuses proportions **(Tableau 7)**.

La très haute digestibilité des spirulines est due à sa paroi composée de muréine, constituant qui est beaucoup plus digeste que les parois cellulosiques classiques.

Tableau 7 : *Composition en acides aminés essentiels de la spiruline*

Composition	Pour 10 g de Spiruline	% AJR
Isoleucine	350 mg	50
Leucine	540 mg	49
Lysine	290 mg	36
Méthionine	140 mg	70
Phénylalanine	280 mg	140
Thréonine	320 mg	64
Tryptophane	90 mg	36
Valine	400 mg	50

B.2 Lipides

Selon la majorité des publications, les lipides représentent généralement 6 à 8 % du poids sec de la spiruline (Xue et al., 2002), mais peuvent atteindre jusqu'à 11 % (Babadzhanov et al., 2004). Ces variations quantitatives mais aussi qualitatives sur la composition des lipides peuvent provenir de l'heure de la récolte, de la méthode d'extraction et du moyen d'analyse utilisé, ou tout simplement de la variété de spiruline.

La composition en lipides totaux, se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés.

Les lipides peuvent se répartir en deux fractions : une fraction saponifiable, représentant les acides gras (83 %), et une fraction insaponifiable (17 %).

B.2.1 Acides gras

La fraction saponifiable, représentant 4,9 à 5,7 % de la matière sèche de la spiruline (Fox, 1999), est essentiellement composée de monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) (12 %), de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) (8 %), de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (5 %), et de phosphatidylglycérol (26 %) (Xue et al., 2002). A noter que les TG ne sont présents qu'à très faibles taux (0,3 %).

En analysant la composition en acides gras de la spiruline, on constate la présence d'une forte concentration en oméga-3 et surtout en oméga-6. Dans ces deux groupes, on retrouve l'acide alpha linoléique (oméga 3) et l'acide linoléique (oméga-6), qualifiés d'acides gras essentiels car l'organisme humain en a absolument besoin et ne peut les produire.

Ces substances jouent un rôle important dans le bon fonctionnement des systèmes nerveux, cardiovasculaire, immunitaire, ainsi que dans les réactions allergiques et inflammatoires.

L'acide linoléique est le seul oméga-6 qualifié d'essentiel, car il ne peut pas être synthétisé par l'homme, contrairement aux autres acides gras oméga-6, et notamment l'acide gamma-linolénique. Cependant, certains obstacles peuvent nuire à cette conversion telle que la consommation excessive de cholestérol et d'alcool. Il est donc important de consommer des produits qui sont des sources directes de l'acide gamma-linolénique car celui-ci est un précurseur des médiateurs chimiques des réactions inflammatoires (Falquet, 1997). Or, cet acide est très rare dans l'alimentation, ce qui rend la spiruline très intéressante puisqu'elle figure parmi les meilleures sources de l'acide gamma-linolénique après le lait maternel et certaines huiles (bourrache, cassis et onagre) **(Tableau 8)**.

Tableau 8 : *Composition en acides gras de la spiruline*

Composition	% AJR pour 10 g de spiruline
Palmitique (C 16 : 0)	25,8
Palmitoléique (C 16 : 1)	3,8
Stéarique (C 18 : 0)	1,7
Oléique (C 18 : 1)	16,6
Linoléique (C 18 : 2)	40,1
Gamma-Linolénique (C 18 : 3)	40,1

B.2.2 Lipides insaponifiables

La fraction insaponifiable est essentiellement composée de stérols, de terpènes et de paraffines (hydrocarbures saturés). Cette fraction représente 1,1 à 1,3 % de la matière sèche de la spiruline (Fox, 1999).

Certains des stérols présents pourraient partiellement expliquer l'activité antimicrobienne de cette microalgue. Les terpènes sont responsables de la propriété odoriférante de cette

cyanobactérie. Quant aux paraffines, elles sont retrouvées généralement dans une multitude de sources alimentaires.

B.3 Glucides

Les glucides représentent 15 à 25 % de la matière sèche de la spiruline.
Ces hydrates de carbone composent notamment sa membrane cellulaire. Comme les bactéries Gram négatif, la paroi des spirulines est formée de glucosamine et d'acide muramique associés à des peptides.
La glucosamine, le rhamnose et le glycogène sont les principaux polymères retrouvés au sein de la spiruline et ceux-ci sont facilement absorbés par l'organisme.
La spiruline est également composée de polysaccharides sulfatés spécifiques comme le calcium-spirulan (ou spirulane-calcique) (un chapitre lui sera consacré ultérieurement : Partie II, chapitre C.2.2) et le sodium-spirulan (ou spirulane-sodique). Ces deux polysaccharides sont porteurs de nombreux résidus sulfatés et se composent de rhamnose, ribose, mannose, fructose, galactose, xylose, glucose, d'acide glucuronique et galacturonique ainsi que d'ions calcium ou sodium. D'après certaines études, ces polysaccharides auraient des propriétés anticoagulantes, immunostimulantes et antivirales (Lee et al., 2001; Yamamoto et al., 2003).
De plus, au sein de la spiruline les glucides simples ne sont présents qu'en très faibles quantités.

B.4 Acides Nucléiques

La spiruline contient 4,2 à 6 % d'acides nucléiques totaux (30 % ADN et 70 % ARN) dans sa matière sèche (Ross and Dominy, 1990). Un aliment riche en acides nucléiques peut produire en grande quantité, de l'acide urique par dégradation biochimique des purines. Un excès de cet acide entraine l'apparition de calculs rénaux et de crises de goutte. Il est admis que la dose maximale d'acides nucléiques tolérables à long terme est de 4 g / jour pour un adulte. Cela reviendrait à consommer 80 g de spiruline sèche pour atteindre cette dose, sachant qu'il est préconisé de ne consommer quotidiennement que 10 g au maximum.

B.5 Vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines **(Tableau 9)**. Ces dernières sont des substances sans valeur énergétique, mais vitales. Excepté les vitamines K et D, l'homme est incapable de les fabriquer. C'est pourquoi une alimentation équilibrée apporte à l'être humain les vitamines nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, contrairement aux macronutriments, les vitamines exercent leurs actions à très faibles doses.

Tableau 9 : *Composition en vitamines de la spiruline*

Composition	Pour 10 g de Spiruline	% AJR
Vitamines liposolubles		
Vitamine A (β-carotène)	7-20 mg	1000
Vitamine E (tocophérol)	0,5 - 1,9 mg	5 - 19
Vitamine K	0,2 mg	200
Vitamines hydrosolubles		
Vitamine B1	0,34 - 0,5 mg	26 - 38
Vitamine B2 (riboflavine)	0,3 - 0,46 mg	18 - 28
Vitamine B3	1,3 mg	7,5
Vitamine B5	0,04 - 0,25 mg	0,8 - 5
Vitamine B6	0,05 - 0,08 mg	2,8 - 4,5
Vitamine B8	0,5 µg	0,25
Vitamine B9	5 µg	1,6
Vitamine B12	1 - 3,4 µg	100
Vitamine C	4-18 mg	3-20

On distingue deux groupes de vitamines. D'une part, les vitamines liposolubles, qui regroupent les vitamines A, D, E et K. Elles sont essentiellement apportées par les aliments d'origine animale et les huiles végétales. L'organisme peut les stocker. D'autre part, on retrouve les vitamines hydrosolubles, qui rassemblent la vitamine C et les vitamines du groupe B. Contrairement aux vitamines liposolubles, elles ne peuvent pas être stockées dans l'organisme (excepté la vitamine B12), ce qui signifie que leurs apports doivent être assurés quotidiennement par notre alimentation. Ces vitamines sont fournies par la quasi totalité des aliments.

De par leur quantité, trois vitamines dominent dans la composition de la spiruline : le β-carotène, la vitamine E et la vitamine B12.
Pour les vitamines liposolubles, on retrouve une forte teneur en β-carotène, précurseur de la vitamine A. L'organisme peut transformer en vitamine A certains caroténoïdes provenant des végétaux qu'on qualifie de provitamine A. Parmi eux, le β-carotène est de loin la provitamine A la plus importante. Cette forme, β-carotène, pourrait représenter jusqu'à près de 80 % des caroténoïdes totaux présents dans la spiruline (Pierlovisi, 2007). Cette vitamine joue un rôle essentiel dans la vision (Aslam et al., 2013; Chew, 2013), et est impliquée dans la croissance des os (Yamaguchi, 2012). Elle a également des propriétés antioxydantes en tant que piégeur de radicaux peroxyls (Jomova and Valko, 2013). De plus, plusieurs travaux ont démontré le rôle protecteur du β-carotène contre l'apparition de nombreux cancers (Veeramachaneni and Wang, 2009; Lai et al., 2014).

Une autre vitamine liposoluble, la vitamine E, a également été décelée en quantité non négligeable au sein de la spiruline. Cette dernière joue un rôle préventif dans le développement des cancers, des MCV et du vieillissement, en empêchant les radicaux libres d'endommager nos cellules et tissus, et en limitant les effets néfastes du cholestérol (Sesso et al., 2008; Lippman et al., 2009; Klein et al., 2011). Ces actions on été décrites dans un chapitre précédent (Partie I, chapitre E.2.3.1).

Parmi les vitamines hydrosolubles, on retrouve la vitamine B12 en très grande quantité. La spiruline en contient 4 fois plus que le foie cru (longtemps considéré comme la source alimentaire la plus riche en vitamine B12). Elle intervient aussi dans la formation de l'ADN et des globules rouges. Cependant, il semblerait que sa biodisponibilité soit remise en cause chez l'homme (Yates, 2001). En effet, la plupart des cyanobactéries utilisées en compléments alimentaires contiendrait une part prédominante de pseudo vitamine B12, inactive chez l'homme (Watanabe, 2007).

B.6 Minéraux et Oligoéléments

La spiruline contient tous les sels minéraux et les oligoéléments dont l'organisme a besoin au quotidien **(Tableau 10)**.

Tableau 10 : *Composition en minéraux et oligoéléments de la spiruline*

Composition	Pour 10 g de Spiruline	% AJR
Calcium	25 - 140 mg	2,5 - 14
Fer	5 - 18 mg	31 - 112
Magnésium	20 - 40 mg	6,5 - 13
Phosphore	67 - 90 mg	7,5 - 10
Potassium	64 - 154 mg	1,8 - 4,4
Zinc	0,2 - 0,4 mg	1,3 - 2,6
Cuivre	0,03 - 0,120 mg	1,5 - 6
Manganèse	0,25 - 0,37 mg	5 - 7,5
Sodium	45 - 200 mg	9 - 40
Chrome	2,8 µg	0,12
Sélénium	0,01 mg	20

Les minéraux et les oligoéléments entrent dans la composition de tous les tissus corporels et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. La spiruline contient plus de calcium que le lait, et c'est l'un des aliments les plus riches en magnésium et en phosphore. Ces éléments bénéficient d'une excellente biodisponibilité. De ce fait, la spiruline est bénéfique pour lutter contre la décalcification osseuse.

De plus, le fer est également présent en grande quantité dans la spiruline et il est hautement assimilable. Celui-ci bénéficie d'une meilleure absorption que le fer contenu dans la viande (Puyfoulhoux et al., 2001). De surcroît, il est essentiel à l'organisme humain car il intervient dans la constitution de l'hémoglobine, de la myoglobine et d'enzymes jouant un rôle capital dans de nombreuses réactions métaboliques. Sachant que les bonnes sources en fer sont rares et que les carences en fer sont très répandues, la spiruline contribue à bénéficier de cet oligoélément indispensable pour lutter contre toutes sortes de troubles.

B.7 Pigments

La spiruline est considérée comme un véritable aliment « solaire », aux propriétés bénéfiques pour l'organisme. En effet, l'activité biologique des pigments est étroitement liée à l'intensité lumineuse reçue, c'est-à-dire que plus la spiruline recevra d'énergie lumineuse, captée par ses pigments, meilleurs seront ses effets thérapeutiques.

La spiruline contient trois sortes de pigments : la chlorophylle (essentiellement la chlorophylle a), les caroténoïdes (essentiellement le β-carotène, dont l'intérêt a été montré précédemment), et des phycobiliprotéines (majoritairement la phycocyanine) **(Tableau 11)**.

Tableau 11 : *Composition en pigments de la spiruline*

Composition	Pour 10 g de Spiruline
Chlorophylle a	115 mg
Phycocyanine	1500 - 2000 mg
Caroténoïdes β-carotène	37 mg 7 - 20 mg

La spiruline est très riche en chlorophylle. Son taux, pouvant avoisiner 1 %, est l'un des plus élevés que l'on puisse trouver dans la nature. Ce pigment favorise l'absorption du fer dans le sang et la circulation sanguine. Il est également bénéfique pour le système intestinal car il permet la détoxification de l'organisme (Young and Beregi, 1980). Par ailleurs, la chlorophylle a des effets antioxydants (Lanfer-Marquez et al., 2005; Serpeloni et al., 2011), anti-mutagéniques (Kumar et al., 2004), et anti-cancéreux (Simonich et al., 2008; McQuistan et al., 2012).

La spiruline contient surtout un pigment qui lui est propre, la phycocyanine. Ce pigment est un puissant antioxydant qui possède de nombreuses activités thérapeutiques (Wu and Ho, 2007) (Cette partie sera traitée ultérieurement).

B.8 Enzymes

La spiruline contient de nombreuses enzymes, dont la plus importante est la SOD, considérée comme l'un des plus puissants antioxydants enzymatiques. Ses effets bénéfiques ont été présentés dans un chapitre précédent (Partie I, chapitre E.2.2.1).

En fonction de la période de la récolte, la spiruline peut posséder la SOD en plus ou moins grande quantité. En effet, il semblerait que l'activité de la SOD dans la spiruline soit augmentée notamment à basse température et lors d'une forte exposition à la lumière (Liu et al., 2008).

C Activités thérapeutiques de la spiruline

Le premier intérêt de la spiruline a d'abord été un intérêt nutritionnel, dû à sa composition exceptionnelle bénéfique à l'homme. Parallèlement dans les années 90, des recherches plus poussées sur la spiruline ont été réalisées, permettant de découvrir que cette dernière possède également diverses activités thérapeutiques très intéressantes pour l'être humain.

C.1 Activité spécifique de la spiruline

Tous les travaux réalisés depuis de nombreuses années ont permis de mettre en évidence les bienfaits de la spiruline sur de nombreuses pathologies, tels que les MCV (Paredes-Carbajal et al., 1998; Ku et al., 2013), les maladies neurologiques (Pabon et al., 2012), les cancers (Grawish et al., 2010; Ouhtit et al., 2014), la stéatose hépatique (Moura et al., 2011; Pak et al., 2012), l'ostéoporose (Gupta et al., 2010), et le diabète de type 2 (Mani et al., 2000; Joventino et al., 2012). De plus, elle aurait même un effet sur le virus du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) (Ayehunie et al., 1998; Teas and Irhimeh, 2012).
Les actions de la spiruline ont été remarquées sur plusieurs composantes liées à toutes ses pathologies.

C.1.1 Hypolipidémie

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'aptitude de la spiruline à lutter contre la dyslipidémie (Yang et al., 2014). En effet, elle peut réduire le taux plasmatique du cholestérol total et des LDL-C (Colla et al., 2008).
De plus, elle a la capacité d'augmenter la concentration plasmatique en HDL-C, ce qui permet de lutter contre le développement des plaques d'athérome (Cheong et al., 2010).

C.1.2 Stress Oxydant

La spiruline a un impact également sur une composante retrouvée dans de nombreuses pathologies, le stress oxydant (Muga and Chao, 2014). Elle agit soit en diminuant les sources du stress oxydant, comme la NADPH oxydase (Riss et al., 2007) ou en réduisant directement

la peroxydation lipidique (Banji et al., 2013), soit en augmentant la concentration des enzymes antioxydantes, comme la GPx et la CAT aussi bien chez l'animal que chez l'homme (Deng and Chow, 2010; Hwang et al., 2011).

C.1.3 Inflammation

L'inflammation, qui est également une composante majeure de plusieurs pathologies et qui est étroitement liée au stress oxydant, peut être diminuée par la spiruline. Une multitude de travaux ont démontré les effets anti-inflammatoires de la spiruline (Muga and Chao, 2014). Elle réduit l'activité de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF-α. Elle est également capable d'inhiber le facteur de transcription NF-κB. Ce dernier permet la production de certaines cytokines inflammatoires (Deng and Chow, 2010).

C.1.4 Toxicité

Du fait de sa production massive, sa consommation humaine pour ses qualités nutritionnelles et ses effets thérapeutiques, diverses études ont évalué la présence éventuelle d'une toxicité de cette microalgue.
Ainsi, de nombreux travaux de toxicité réalisés sur la spiruline, n'ont révélé aucun effet néfaste pour l'organisme (Chamorro et al., 1988, 1997; Salazar et al., 1998; Hutadilok-Towatana et al., 2008, 2010).

C.2 Constituants fonctionnels principaux

Les propriétés thérapeutiques diverses observées chez la spiruline sont dues à des molécules complexes qui ont été isolées au cours de ces dernières années. Ces molécules, qui présentent le plus d'intérêt, sont la phycocyanine, un pigment protéique, et la calcium-spirulan, un polysaccharide sulfaté.

C.2.1 Phycocyanine

C.2.1.1 Phycobilisome

Le phycobilisome est un complexe macromoléculaire collecteur de l'énergie lumineuse permettant la photosynthèse chez les cyanobactéries.

Les phycobilisomes sont attachés en matrice régulière à la surface externe de la membrane du thylacoïde, siège de la photosynthèse (Guan et al., 2007). Leur principale fonction est de servir de récepteur des rayons lumineux, dans des domaines d'ondes faiblement utilisées par la chlorophylle, par l'appareil photosynthétique de la spiruline, et convertir cette énergie lumineuse en énergie électro-biochimique (Fernández-Rojas et al., 2014). Ils constituent donc les pigments accessoires de la photosynthèse en complément de la chlorophylle.

Ces complexes macromoléculaires sont composés d'un cœur sur lequel sont fixées des projections radiaires (ou bras) (Shi et al., 2011) **(Figure 27)**.

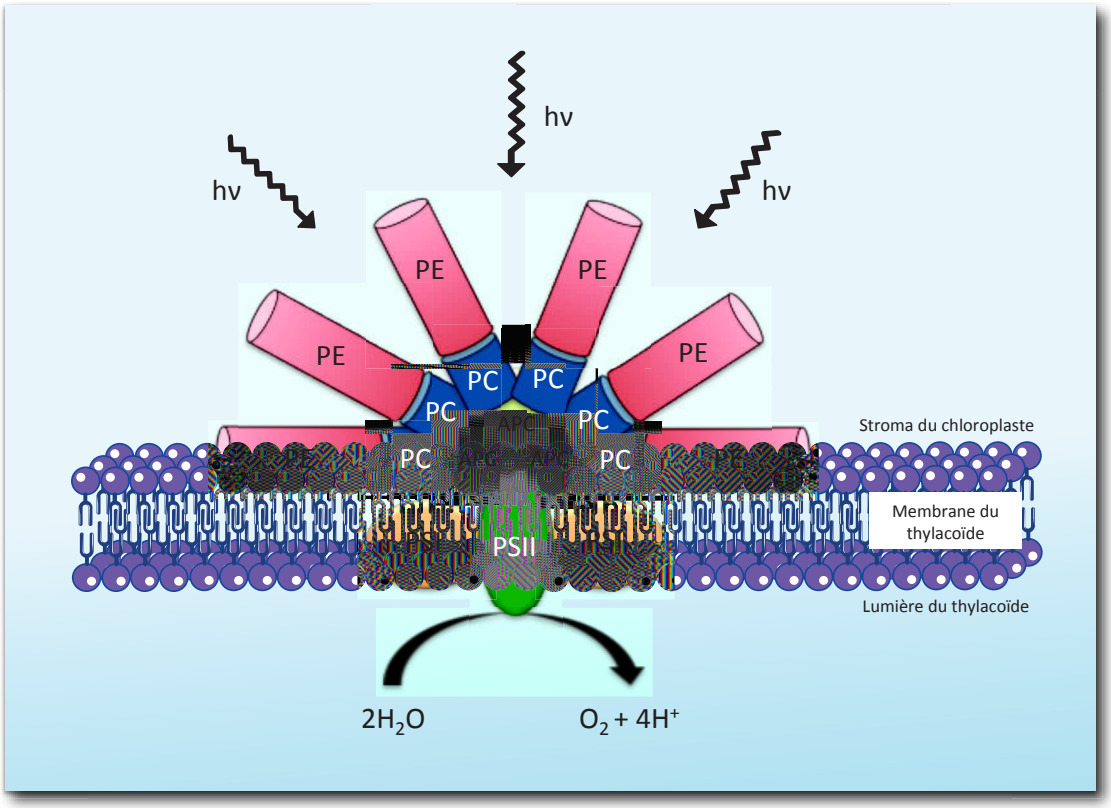


Figure 27 : *Structure d'un phycobilisome.*

hv : énergie lumineuse ; PE : Phycoérythrine ; PC : Phycocyanine ; APC : Allophycocyanine ; PSI : Photosystème I ; PSII : Photosystème II

C.2.1.2 Phycobiliprotéines

Le complexe macromoléculaire formant les phycobilisomes est composé de phycobiliprotéines. Ce sont des pigments hydrosolubles de la photosynthèse.
Les phycobiliprotéines sont constituées d'une partie protéique de haute masse moléculaire qui portent, par des liaisons covalentes, des chromophores. Ces derniers sont des groupes bilins composés d'un noyau tétrapyrrolique ouvert, responsable de leur couleur (Fernández-Rojas et al., 2014). Les principaux chromophores sont la phycocyanobiline, la phycoérythrobiline, la phycourobiline et la cryptovioline. Chacun d'eux présente un spectre d'absorption spécifique modifié par les interactions avec l'apoprotéine.
On retrouve quatre principales phycobiliprotéines : l'allophycocyanine, la phycocyanine (protéine majeure de la spiruline), la phycoérythrine et la phycoérythrocyanine.

Les phycobiliprotéines sont désintégrées quand elles sont extraites dans un tampon, par conséquent, les phycobiliprotéines perdent leur capacité à transférer des électrons dans le processus de la photosynthèse, conférant ainsi aux phycobiliprotéines une propriété fluorescente (Eriksen, 2008). Comparées à d'autres fluorophores, les phycobiliprotéines ont un coefficient d'extinction molaire élevé et un domaine de fluorescence élevé, ce qui en fait d'excellents fluorophores. Elles peuvent être conjuguées aux immunoglobulines et à la protéine A. De ce fait, grâce à cette propriété, les phycobiliprotéines ont été utilisées dans de nombreuses applications médicales comme l'histologie, la microscopie à fluorescence et l'immunologie (Kuddus et al., 2013).

C.2.1.3 Propriétés de la phycocyanine

La phycocyanine est le pigment le plus abondant de la spiruline représentant plus de 15 % de son poids, d'où le nom d'algue bleue, souvent associé à la spiruline.
Le composant chromophore retrouvé dans la phycocyanine est la phycocyanobiline. La structure de cette dernière est similaire à la structure de la bilirubine et de la biliverdine (Lakshmi and Uma, 2008) **(Figure 28)**. Cette similitude de structure pourrait expliquer en partie les effets antioxydants de la spiruline, car l'action antioxydante de la bilirubine a été démontré précédemment (Partie I, chapitre E.2.3.4). La phycocyanobiline est un tétrapyrrole à chaine ouverte responsable de la couleur intense bleue de la phycocyanine.

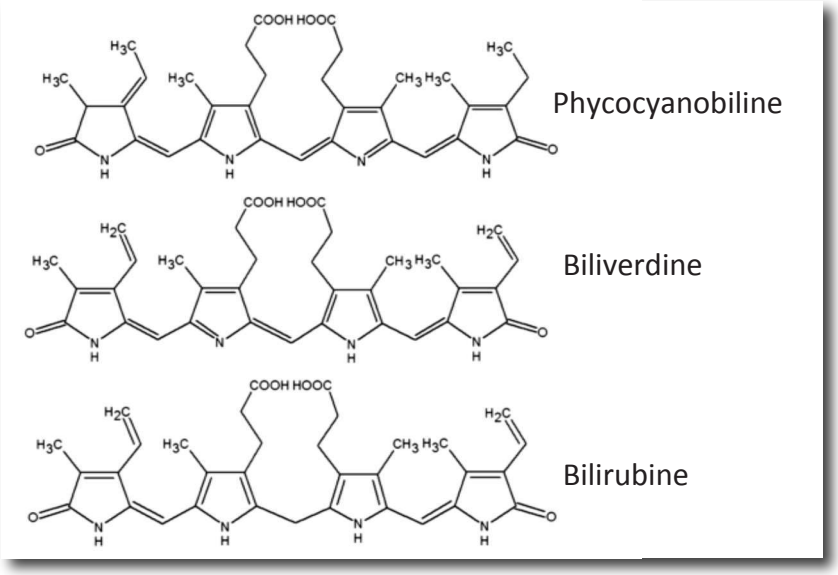


Figure 28 : *Structure chimique de la phycocyanobiline, biliverdine et bilirubine* (Fernández-Rojas et al., 2014)

Constituant majeur du thylacoïde, la phycocyanine semble être ainsi le principal responsable des propriétés thérapeutiques bénéfiques attribuées à la spiruline.

De multiples études ont mis en évidence les bienfaits de ce pigment sur toutes les composantes liées aux MCV comme la dyslipidémie, le stress oxydant et l'inflammation entre autres, composantes qui sont impliquées dans de nombreuses pathologies.
En effet, ce pigment a une action hypolipémiante. Il diminue la concentration plasmatique du cholestérol total, du cholestérol porté par les LDL (LDL-C) ainsi que des lipides hépatiques et en augmentant le cholestérol porté par les HDL (HDL-C) (Nagaoka et al., 2005).
Il a un rôle de puissant antioxydant, en augmentant la capacité antioxydante du plasma, (CAOP), les activités SOD et GPx (Ou et al., 2011; Rodríguez-Sánchez et al., 2012), et en réduisant l'activité de la NADPH oxydase (Riss et al., 2007).
Ce pigment possède des effets anti-inflammatoires (Romay et al., 2003; Shih et al., 2009), en réduisant la production de TNF-α.
Enfin, la phycocyanine permet de prévenir l'hypertension (Ichimura et al., 2013).

C.2.2 Calcium-spirulan

Le calcium-spirulan est un polysaccharide sulfaté, chélaté à du calcium. Il se compose en majorité de rhamnose et de fructose **(Tableau 12)**.

Tableau 12 : *Composition du calcium-spirulan*

Composants	% moléculaire
Rhamnose	60
Fructose	46
Acide glucuronique	9,6
Glucose	6,4
Acide galacturonique	5,4
Galactose	3,3
Ribose	3
Mannose	1,1
Xylose	0,8

Moins connu que la phycocyanine, ce polysaccharide sulfaté fait tout de même l'objet de diverses études qui ont permis de révéler certaines propriétés intéressantes.
Deux propriétés essentielles se dégagent de ce polysaccharide.
Il a une activité anticoagulante (Majdoub et al., 2009) en activant directement l'héparine cofacteur II (Hayakawa et al., 2000, 2003), qui est un inhibiteur de sérine-protéase, endiguant ainsi la formation de thrombine. De ce fait, il empêche la formation d'un thrombus.

Enfin, il aurait également une activité antivirale (Rechter et al., 2006), plus particulièrement en inhibant la réplication de certains virus comme celui de l'herpès (Hayashi et al., 1996a, 1996b).

La spiruline peut donc être considérée comme le complément alimentaire de demain, d'une part, grâce à sa haute qualité nutritionnelle et d'autre part, grâce à ses diverses propriétés thérapeutiques extrêmement bénéfiques pour l'homme.

Partie III - Silicium

A Généralités

Le silicium (Si) est l'élément le plus important de la lithosphère (27,2 %) après l'oxygène (45,5 %) (Greenwood and Earnshaw, 1997). Le silicium a d'abord été connu pour un grand nombre de ses propriétés physiques et chimiques, comme par exemple, son pouvoir de semi-conducteur qui est utilisé dans diverses applications scientifiques et techniques (Jurkić et al., 2013).

Les caractéristiques du silicium, ainsi que la complexité structurelle de ses composés, ont attiré l'attention des chercheurs ces dernières années (Martin, 2007). Le dioxyde de silice ou silice (SiO_2), en particulier, est le composé chimique le plus étudié après l'eau. C'est également la substance inorganique la plus répandue qui contient du silicium (Greenwood and Earnshaw, 1997). En fait, la silice est la forme anhydre de l'acide orthosilicique ($Si(OH)_4$), lequel est soluble dans l'eau et stable dans les solutions aqueuses fortement diluées. La majorité de la silice présente dans les milieux aqueux et les océans est disponible sous forme d'acide orthosilicique, ce qui en fait un composé important en chimie et biologie.

La privation de silicium n'induit pas une interruption dans le cycle de la vie chez les mammifères. De plus, on ne lui connaît pas une fonction biochimique définie. De ce fait, le silicium n'est généralement pas accepté comme un élément essentiel pour les animaux supérieurs et les hommes. En effet, on n'a pas identifié une seule molécule organique biologique qui contienne ou nécessite du silicium. A l'heure actuelle, aucune liaison Si-O-C ou Si-C n'est connue dans la nature pour nous aider à expliquer la myriade de recherches qui vise à décrire le caractère essentiel du silicium (Exley, 1998).

Or, depuis ces quarante dernières années, des rapports sur les effets bénéfiques du silicium ont été établis, notamment sur les tissus conjonctifs et la formation osseuse chez les animaux supérieurs et l'homme. En raison de sa très faible biodisponibilité pour l'organisme humain, son impact sur le processus métabolique n'est que partiellement connu et mal compris.

B Différentes formes de silicium

Le silicium à l'état pur est rare. On le trouve généralement sous différentes formes qui sont réparties en trois familles : minéral à l'état solide, minéral à l'état liquide et organique.

B.1 Silicium minéral à l'état solide

Il s'agit de composés oxydés, la silice (SiO_2) et les silicates.
La silice naturelle provient de la diatomite (roche formée dans le fond des océans par l'accumulation d'algues) et du sable. Cette silice n'est jamais pure, elle est toujours associée à divers composants métalliques qui entrent dans la structure et font la diversité des formes.
Les silicates sont des anions qui se lient à divers cations métalliques (sodium, potassium, magnésium, etc.).
La silice et les silicates se polymérisent spontanément en polymères très denses. Sous cette forme minérale solide, les structures sont quasi insolubles dans l'eau et de ce fait non assimilables par l'organisme humain.

B.2 Silicium minéral à l'état liquide

L'acide orthosilicique, $Si(OH)_4$, est la forme soluble de la silice. C'est la forme quasi exclusive du transport du silicium dans le milieu naturel que l'on retrouve dans certaines plantes. Cette forme représente la meilleure biodisponibilité pour l'organisme bien qu'elle soit sous une forme minérale (Calomme and Vanden Berghe, 1997; Jugdaohsingh et al., 2002). Cependant, sa biodisponibilité reste relativement faible. Certaines plantes sont riches en silicium telles que la prêle, l'ortie ou le bambou. Dans la plante, le silicium a de multiples fonctions : structure, croissance et protection (Liang et al., 2007; Xu et al., 2015). Il joue un rôle important dans la prévention des stress biotiques et abiotiques (Meunier, 2003).

B.3 Silicium organique

Afin d'être considérée comme une molécule organique, celle-ci doit contenir au moins un atome de carbone dans sa structure, ce qui la rend hautement assimilable pour l'organisme.

Or, à l'état naturel, il n'existe qu'en très faible quantité du silicium organique que l'on suppose produit par les diatomées (microalgues présentes dans tous les milieux aqueux).

Au début des années 1980, une molécule synthétique de silicium organique a été mise au point, le monométhyl-silanetriol (famille des silanols), de formule $CH_3Si(OH)_3$, fabriquée par la pharma-industrie et issue de la pétrochimie. Cependant, en janvier 2010, suite à une recommandation de l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments (ESFA) (EFSA, 2009b), le parlement européen a publié une nouvelle directive qui interdit ce silicium organique, le monométhyl-silanetriol (Règlement (CE) N°1170 : 2009). De ce fait, toutes les solutions buvables contenant cette molécule ont été prohibées. Néanmoins, cette forme est actuellement encore tolérée, mais uniquement dans la cosmétique « non bio » et sous forme de gels. En effet, le groupe scientifique de l'EFSA a conclu qu'il n'existait à l'heure actuelle aucune preuve expérimentale démontrant la conversion du monométhyl-silanetriol en acide orthosilicique (seule forme connue du silicium assimilable par l'organisme humain). Compte tenu de l'absence de données fiables sur la biodisponibilité du silicium provenant du monométhyl-silanetriol et sur sa toxicité, le groupe scientifique n'a donc pas pu évaluer les éventuels impacts sur la sécurité et la biodisponibilité du silicium provenant de cette source.
Depuis l'interdiction du monométhyl-silanetriol, de nombreux fabricants ont remplacé cette molécule par de l'acide orthosilicique stabilisé par de la choline, dont l'EFSA n'a pas émis de contre indication (EFSA, 2009a). Toutefois, ce produit ne peut pas être considéré comme du silicium organique.

C Besoins et apports

En raison du manque de données, de sa faible biodisponibilité et de son assimilation variable, il est difficile de fixer un apport journalier recommandé pour le silicium. De plus, très peu d'informations sur la consommation alimentaire de silicium chez l'homme sont disponibles.

Une consommation moyenne a été rapportée en Finlande (29 mg de Si / jour) (Varo and Koivistoinen, 1980) et dans un régime alimentaire typique britannique (Bowen and Peggs, 1984; Pennington, 1991; Bellia et al., 1994). Ceci correspond à 0,28 - 0,71 mg de Si par kg de poids corporel par jour. Ces données sont dans la même gamme que les apports moyens de

silicium estimés aux USA (30 - 33 mg de Si / jour chez l'homme et 24 - 25 mg de Si / jour chez la femme) (McNaughton et al., 2005). Ainsi, en se basant sur toutes les données issues des différents travaux de recherche sur la consommation du silicium, l'EFSA a estimé une recommandation journalière de silicium comprise entre 20 et 50 mg / jour pour un homme (EFSA, 2004). De plus, il semblerait que le corps ait besoin de 9 à 14 mg de silicium quotidiennement pour assurer son bon fonctionnement (Trumbo et al., 2001; Pérez-Granados and Vaquero, 2002).

C'est le silicium sous la forme de l'acide orthosilicique qui semble jouer un rôle dans la distribution du silicium au sein des organismes cellulaires vivants, et représente donc une source majeure pour l'homme et les animaux. Cependant, à forte concentration, au delà de 2 mM, et dans un environnement neutre, l'acide orthosilicique a tendance à se polymériser en différentes formes de silices (colloïdale à solide) (Reffitt et al., 2003).
La silice colloïdale est autorisée par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et utilisée en tant qu'antiagglomérant (E551) dans les compléments alimentaires, les aliments et la cosmétique, mais elle n'a pas de valeur thérapeutique. Cette forme n'est pas absorbable par l'organisme humain et un usage trop concentré et prolongé peut provoquer des inflammations rénales. D'autres formes de silices sont autorisées comme additifs : le silicate de calcium (E552), le silicate alumino-sodique (E555), le silicate alumino-potassique (E556) et le silicate d'aluminium (E559) (AFSSA : Saisine n°2004-SA-0211).

Généralement, le silicium est présent en abondance dans les aliments dérivés des végétaux. On retrouve essentiellement le silicium dans les grains (riz, orge, avoine, blé), les produits céréaliers (céréales, pain, pâtes), les légumes-racines (carottes, betteraves, radis, oignons, pomme de terre), les haricots, les fruits (surtout la banane) ainsi que des fruits secs (raisins) et les noix (Boguszewska-czubara and Pasternak, 2011; Prescha et al., 2012). En revanche, les niveaux de silicium sont beaucoup plus faibles dans les aliments d'origine animale, tels la viande et les produits laitiers (Jurkić et al., 2013). Le silicium est hautement disponible dans les eaux de boissons et sa concentration dépend de l'environnement géologique où celles-ci ont été récoltées (Jugdaohsingh et al., 2002; Sripanyakorn et al., 2005). La bière et le vin sont également des sources alimentaires riches en silicium, contenant des quantités élevées d'acide orthosilicique, la forme biodisponible du silicium (Thiel et al., 2004; González-Muñoz et al., 2008b; Casey and Bamforth, 2010) **(Tableau 13)**. Des infusions de plantes contenant du

silicium (Prêle, Ortie, etc.) peuvent supplémenter un déficit alimentaire de cet élément, ainsi qu'atténuer les symptômes de certaines maladies (Zielecka, 1996).

Tableau 13 : *Sources alimentaires de silicium* (Jugdaohsingh, 2007)

Groupes alimentaire	Teneur en Si (mg / 100 g)	Groupes alimentaire	Teneur en Si (mg / 100 g)
Céréales et Produits céréaliers		Boissons (non alcoolisées)	
Céréales du petit-déjeuner	7,79 ± 6,31	*Eau du robinet*	0,37 ± 0,13
Pain / Farine	2,87 ± 1,60	*Eaux de source et minérale*	0,55 ± 0,33
Biscuit	1,56 ± 0,56	*Thé et Café*	0,51 ± 0,28
Riz	1,54 ± 1,00	*Jus de fruits*	0,38 ± 0,53
Pâtes	1,11 ± 0,47	*Sodas*	0,15 ± 0,04
Fruits		*Boissons à base de lait*	1,30 ± 1,40
Natures et Conserves	1,34 ± 1,30	Boissons (alcoolisées)	
Secs	10,54 ± 5,44	*Bières*	1,92 ± 0,66
Légumes	1,79 ± 2,42	*Vins*	1,35 ± 0,85
Légumineuses	1,46 ± 1,23	*Porto / Xérès*	1,24 ± 1,26
Noix	0,78 ± 0,82	*Liqueur / Spiritueux*	0,13 ± 0,04
Lait et Produits laitiers	0,31 ± 0,21		
Viande	Non détectée		

D *Absorption et biodisponibilité*

Des études sur l'absorption du silicium indiquent que l'acide orthosilicique est la principale source facilement biodisponible pour l'homme mais reste relativement faible, alors que ses polymères ne présentent pas une absorption significative (Jugdaohsingh et al., 2000). Les formes silicates retrouvées dans certains aliments sont hydrolysées en acide orthosilicique facilement biodisponible dans le tube digestif (Barel et al., 2005). Le site précis où l'acide silicique y est absorbé n'est pas bien établi. Cependant, il a été suggéré que les composés de silicium dans les aliments, en présence d'acide chlorhydrique et d'acidité gastrique, sont dégradés pour donner de l'acide orthosilicique, lequel diffuse facilement à travers les muqueuses jusqu'au sang.

Du fait de sa faible biodisponibilité, des travaux ont mis en évidence que le silicium est majoritairement excrété par voie fécale (Bellia et al., 1994; Carlisle, 1997). Néanmoins, des

études ont démontré que 53 % de l'acide orthosilicique administré chez des patients, est éliminé par l'urine (Jugdaohsingh et al., 2000), ce qui prouve son absorption à l'intérieur de l'organisme. La plupart du silicium présent dans le plasma est filtré par les reins (Berlyne et al., 1986; Reffitt et al., 1999), suggérant qu'ils sont une voie principale de son excrétion. En effet, le silicium est facilement excrété car il ne forme aucune liaison avec des protéines plasmatiques (Sripanyakorn et al., 2005). Par conséquent, environ 70 - 80 % de silicium présent dans le plasma sont éliminés par les reins 3 à 8 heures après l'ingestion du repas (Popplewell et al., 1998). Ainsi, l'excrétion urinaire est un bon marqueur de l'absorption du silicium (Widner et al., 1998).
Le fait que la concentration en silicium dans le sang reste relativement constante après l'ingestion d'un repas, prouve qu'il est transféré efficacement aux tissus (Robberecht et al., 2009).

Cependant, il n'a toujours pas été clairement établi comment et surtout si l'organisme peut conserver efficacement des doses adéquates de silicium.

Dans des solutions concentrées, l'acide orthosilicique doit être stabilisé pour éviter sa polymérisation en acide polysilicique et en gel de silice, ce qui entraine une biodisponibilité réduite du silicium. Ce problème a été résolu dans le domaine de la technologie pharmaceutique par l'utilisation du chlorure de choline dans une solution de glycérol. Il en résulte le développement d'une formulation liquide connue sous le nom d'acide orthosilicique stabilisée à la choline. Ceci a été approuvé pour la consommation humaine et ne s'avère pas toxique. L'acide orthosilicique stabilisé par la choline représente une des sources de silicium les plus biodisponibles (EFSA, 2009a).

Un étude déterminant l'absorption du silicium à partir de différents aliments et compléments a montré que l'absorption est la plus élevée pour le monométhyl-silanetriol (dont la consommation liquide est actuellement interdite) et la bière (64 % de la dose), suivi par les haricots verts (44 %), l'acide orthosilicique en solution (43 %), l'acide orthosilicique stabilisé par la choline (17 %) et enfin la banane (4 %) (Sripanyakorn et al., 2009).

E Localisation dans l'organisme

Les nombreuses études cinétiques sur l'absorption et l'élimination du silicium ont permis de le localiser dans l'organisme humain.

En effet, une partie du silicium absorbé est transférée jusqu'aux tissus puisqu'on le retrouve présent dans toutes les structures organiques, y compris le cerveau (Jugdaohsingh, 2007).
Les plus grandes concentrations en silicium ont été retrouvées dans les tissus conjonctifs, notamment dans l'aorte, la trachée, les os, la peau et les tendons (Nielsen, 2014). En outre, à de plus faibles taux, le silicium est également retrouvé dans le foie, le cœur, les muscles et les poumons (Jurkić et al., 2013).
Actuellement, il est difficile de connaître la quantité exacte de silicium dans le corps car plusieurs travaux nous donnent des valeurs relativement opposées. Un étude de 1990 (Creac'h and Adrian, 1990), a montré qu'un homme de 70 kg possédait 7 g de silicium. Or ces dernières années, d'autres études ont mis en évidence que la teneur globale de silicium chez un homme de 70 kg serait comprise entre 140 mg et 700 mg (Bissé et al., 2005; Sripanyakorn et al., 2005). Ces études permettent de classer cet élément comme le troisième élément le plus abondant dans l'organisme après le zinc et le fer.
Tous les tissus contiennent du silicium en grande quantité quand ils sont sains, mais leur volume diminue avec l'âge. En conséquence, au cours des années, ils subissent une dégradation progressive (Bissé et al., 2005).

F Rôle du silicium dans l'organisme

Le silicium représente le troisième élément trace le plus abondant dans le corps humain (Reffitt et al., 1999; Jugdaohsingh et al., 2002). Il est naturellement présent dans les aliments sous la forme de silice, d'acide orthosilicique libre ou lié à certains nutriments. Bien que le silicium soit un élément minéral important dans la vie, il n'a pas reçu une attention particulière. En effet, compte tenu de la diversité de la localisation du silicium, à la fois dans la nature et l'organisme humain, on s'attend à ce que ce dernier joue un rôle important dans la santé humaine et animale.

F.1 Relation silicium et os

Dans les années 1980, les premières études sur la biochimie du silicium, effectuées par Carlisle, ont suggéré une forte relation entre un niveau adéquat de silicium dans la prise alimentaire et une croissance normale des animaux (Carlisle, 1980). En particulier, en ce qui concerne les tissus conjonctifs comme les os, les cartilages, la peau et les cheveux qui sont marqués par un taux bas en silicium. Par la suite, la santé des os est devenue l'un des sujets principaux pour les chercheurs qui étudient le rôle biologique du silicium, essentiellement dû à l'ostéoporose qui, selon l'OMS, fait partie des dix maladies les plus fréquentes et constitue un des plus importants problèmes de santé publique (Spector et al., 2008). Cette maladie est définie comme un trouble squelettique progressif, caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration de la microarchitecture (Marcus, 1996). Le silicium a un rôle important dans la prévention de l'ostéoporose et pourrait constituer un traitement pour lutter contre cette pathologie chez les femmes ménopausées (Price et al., 2013).

Des études *in vitro*, ont indiqué que le silicium favorise la formation osseuse. L'acide orthosilicique, dans des concentrations physiologiques, stimule la synthèse de collagène de type I dans les ostéoblastes humaines et améliore la différenciation ostéoblastique dans la culture (Reffitt et al., 2003). Cependant, l'acide orthosilicique ne semble pas agir sur l'expression du gène de collagène de type I, mais il modulerait l'activité de la prolyl hydroxylase, qui est une enzyme impliquée dans la production de collagène (Keeting et al., 1992).

Des études ont également montré, qu'une privation en silicium chez le rat est accompagnée d'une diminution de la formation de collagène, et d'une baisse de la concentration en hydroxyproline dans le fémur (Seaborn and Nielsen, 2002).

De manière intéressante, l'administration de silicium au cours d'une étude clinique contrôlée, induit une augmentation significative de la densité minérale osseuse du fémur chez des femmes atteintes d'ostéoporose (Eisinger and Clairet, 1993). Une relation directe entre la teneur en silicium et la formation osseuse à été mise en évidence par Moukarzel et son équipe. Ils ont trouvé une corrélation entre la réduction des concentrations en silicium chez les nourrissons alimentés par voie parentérale, avec la diminution du contenu minéral osseux (Moukarzel et al., 1992). Ce fut la première observation d'une possible carence alimentaire du silicium chez l'homme.

De récentes études épidémiologiques ont également indiqué que les apports alimentaires de silicium sont bénéfiques à une bonne santé des os chez l'homme. Le silicium alimentaire est

associé positivement à la densité minérale osseuse de la hanche chez les hommes et les femmes pré-ménopausées dans l'étude de la cohorte de Framingham Offspring (Jugdaohsingh et al., 2004). Toujours selon cette étude, l'effet bénéfique d'une consommation modérée de bière sur la densité minérale osseuse de la hanche et de la colonne vertébrale est dû au silicium présent dans cette boisson (Tucker et al., 2009).

La carence en silicium provoque des déformations ou du retard dans la formation osseuse, ainsi que des problèmes dans le cartilage articulaire et la formation du tissu conjonctif (Rico et al., 2000).

Selon des études récentes, le silicium est colocalisé avec le calcium dans le tissu ostéoïde et de ce fait certaines interactions entre ces éléments ont été suspectées de se produire dans les processus de croissance osseuse et de minéralisation (Perry and Keeling-Tucker, 1998). Dans les premières étapes de la calcification, au niveau des sites actifs de calcification des jeunes os, il existe une relation directe entre le silicium et le calcium, quand la teneur en calcium dans le tissu osseux est très faible. Par conséquent, il a été suggéré que le silicium est associé au calcium dans le stade précoce de la formation osseuse. Il a été ainsi démontré que le silicium alimentaire augmente le taux de minéralisation, en particulier chez les rats déficients en calcium (Kim et al., 2009).

F.2 Relation silicium et MCV

L'importance du silicium dans la physiopathologie cardiovasculaire a été mise en évidence dès les années 1960, sur des modèles animaux (Gendre, 1967). L'effet anti-athéromateux du silicium a été confirmé des années plus tard (Loeper et al., 1979, 1988). Selon ses auteurs, le silicium exercerait cette action, principalement par l'augmentation de la perméabilité membranaire de l'artère.

Les observations épidémiologiques ont conforté ce point de vue chez l'homme. En effet, une relation inverse entre l'ingestion de silicium et le développement de l'athérosclérose a été démontrée (Schwarz et al., 1977).

Depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence les effets bénéfiques du silicium sur les MCV. Le manque de silicium serait un facteur étiologique important dans le déroulement de l'athérosclérose car le taux de silicium décroit avec l'âge et accélère le développement de la pathologie.

On sait que le silicium intervient dans la synthèse de l'élastine et du collagène (Seaborn and Nielsen, 1993) et les parois artérielles en sont essentiellement composées. Ces protéines assurent les propriétés contractiles de l'artère. L'aorte qui est un des tissus les plus riches en silicium, contient 40 % d'élastine.
De plus, il existe des preuves que le silicium alimentaire est capable de réduire les niveaux plasmatiques de VLDL-C et de LDL-C (Wachter et al., 1998) et inhibe significativement le processus d'athérosclérose induit par un régime riche en cholestérol (Peluso and Schneeman, 1994).

De plus, la présence de silicium dans le tissu aortique réduit la pression artérielle chez le rat spontanément hypertendu et supprime dans la paroi aortique, l'expression des gènes de l'angiotensinogène (Maehira et al., 2011).

F.3 Relation silicium et Alzheimer

L'aluminium (sous forme d'ion Al^{3+}) est une neurotoxine bien connue (Exley, 2014). Les sels d'aluminium peuvent accélérer les dommages oxydatifs des biomolécules. Il a largement été démontré que l'augmentation de l'aluminium est l'un des facteurs contribuant au développement de maladies cognitives, et notamment la maladie d'Alzheimer (Perl, 1985; Candy et al., 1986; Flaten, 2001; Bhattacharjee et al., 2014; González-Domínguez et al., 2014). En réduisant la biodisponibilité de l'aluminium, il est possible de réduire sa neurotoxicité.
En 1996, une relation est établie entre les déficiences cognitives chez l'homme et le taux d'aluminium / silicium dans les eaux de boisson (Jacqmin-Gadda et al., 1996). Des taux élevés d'aluminium semblent avoir un effet néfaste sur la fonction cognitive lorsque la concentration en silicium est faible. En revanche, si ces mêmes concentrations d'aluminium sont combinés à des taux élevés de silicium, on observe des effets protecteurs.
L'effet bénéfique apparent du silicium sur la fonction cognitive est dû à la réaction qui se produit entre le silicium et l'aluminium pour former un aluminosilicate (Gillette Guyonnet et al., 2007). La formation d'un tel composé empêche la rétention et l'absorption de l'aluminium, évitant ainsi l'accumulation chronique d'aluminium qui peut causer ou augmenter la neurodégénérescence dans le cerveau (Domingo et al., 2011).

La consommation en quantité modérée de bière chez l'homme et d'acide orthosilicique chez les animaux conduit à une réduction de l'absorption d'aluminium par le tube digestif et un ralentissement de l'accumulation de ce métal dans le tissu cérébral (González-Muñoz et al., 2008a, 2008b).

Des études épidémiologiques ont confirmé ces effets, en montrant une relation inverse entre la concentration de silicium dans les eaux de boisson et le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Rondeau et al., 2000; Gillette-Guyonnet et al., 2005).

F.4 Relation silicium et système immunitaire

A la fin des années 1980, une étude a suggéré que le silicium pouvait jouer un rôle dans le cycle cellulaire des lymphocytes. L'ajout de silicium (sous forme de monométhyl-silanetriol) dans le milieu de culture de deux types de cellules immunitaires, stimule d'une part la prolifération des lymphocytes, et diminue d'autre part la prolifération des lymphoblastes. De plus, l'effet du silicium sur la croissance cellulaire est corrélé négativement avec l'activité mitotique des deux types de cellules immunitaires en culture (Henrotte et al., 1988).

Cet effet du silicium alimentaire sur le système immunitaire n'a reçu que très peu d'attention jusqu'en 2002, où une étude a démontré que des rats recevant une faible dose en silicium présentent un déficit de la prolifération de lymphocytes au niveau de la rate (Seaborn et al., 2002).

Depuis, d'autres travaux ont mis en évidence que l'apport ou la privation de silicium alimentaire pourrait affecter la réponse immunitaire et/ou inflammatoire. Ainsi, du collagène de type II a été injecté à des rats pour induire une inflammation. Ces derniers ont reçu un régime soit riche, soit pauvre en silicium. Les rats dépourvus de silicium possèdent un plus grand nombre de lymphocytes circulants et une baisse des neutrophiles par rapport aux rats ayant reçu le régime supplémenté en silicium (Nielsen, 2008). Ceci suggère bien l'importance du silicium sur le système immunitaire.

De plus amples recherches sont attendues afin d'établir en détail les rôles bénéfiques du silicium dans la réponse immunitaire.

F.5 Relation silicium, peau et cheveux

Le signe typique du vieillissement de la peau est l'effondrement des niveaux de silicium et d'acide hyaluronique dans les tissus conjonctifs. Cela se traduit par une perte d'hydratation et d'élasticité de la peau. Or, on sait que l'acide orthosilicique peut stimuler la production de collagène et ainsi rétablir les fonctions du tissu conjonctif (Reffitt et al., 2003).
L'aspect des cheveux et des ongles peut aussi être affecté par les faibles taux de silicium, étant donné qu'ils sont essentiellement constitués de kératine. Une étude chez des femmes recevant un traitement à base de silicium a montré une nette amélioration de la structure des glycosaminoglycanes de la peau et celle de la kératine des cheveux et des ongles (Barel et al., 2005).

En raison de sa faible biodisponibilité, le rôle du silicium dans la biologie humaine est encore mal compris. Toutefois, les études présentées dans cette partie peuvent suggérer une influence bénéfique de ce dernier sur l'organisme humain lors de certaines pathologies, comme l'athérosclérose, l'ostéoporose et les maladies cognitives. Le silicium peut également réduire les effets négatifs de certains processus dus au vieillissement. Il est très important pour la régénération des tissus, l'activation de processus vitaux pour les cellules et l'amélioration de l'immunité générale de l'organisme.
Par conséquent, de plus amples études sur la biologie du silicium, sa biochimie, son homéostasie, ses interactions avec des éléments minéraux essentiels ainsi que d'autres molécules biologiques importantes, sont nécessaires.

Objectifs de l'étude

En raison de sa faible biodisponibilité, les effets bénéfiques du silicium contre certaines pathologies cardiovasculaires n'ont reçu que très peu d'attention ces dernières années. D'autres molécules ont pris une longueur d'avance dans la prévention de ces maladies, les polyphénols par exemple. En effet, ces derniers sont retrouvés dans tous les fruits et les légumes, et présentes une meilleure biodisponibilité (Auger et al., 2005; Décordé et al., 2010). Il reste cependant clairement démontré que le silicium, qui permet la formation du collagène et de l'élastine, intervient dans la prévention de l'athérosclérose.

C'est à ce moment-là qu'entre en jeu la spiruline. Cette microalgue est d'abord connue pour ses qualités nutritionnelles exceptionnelles, mais pas seulement. De nombreux travaux ont montré ses actions bénéfiques sur diverses pathologies, notamment l'athérosclérose.
Plusieurs études au sein de notre équipe ont mis en évidence les effets de spirulines enrichies en différents éléments, comme le sélénium ou le fer, sur certaines caractéristiques de la pathologie athéromateuse, induite nutritionnellement sur un modèle animal, et particulièrement sur les aspects lipides et oxydatifs (Cases et al., 2002; Riss et al., 2007). L'intérêt de ces travaux réside dans la capacité de la spiruline à incorporer des oligoéléments afin de les rendre hautement biodisponibles pour l'animal. Ces études ont permis de mettre la spiruline en avant et d'amplifier son champ d'action pour la santé de l'homme.

L'entreprise Phyco-Biotech, productrice de spiruline, s'est donc intéressée au problème de la faible biodisponibilité du silicium, tout en connaissant les propriétés bénéfiques de la spiruline. Phyco-Biotech a réussi à mettre au point une spiruline enrichie à hauteur de 1 % en silicium. Cette production fait l'objet d'un dépôt de brevet **(Demande N°1453113)**. Le silicium se retrouve ainsi au sein de la spiruline, ce qui est susceptible de rendre le silicium hautement disponible pour l'homme.

Le but de ces travaux, dans un premier temps, a donc été de savoir si ce nouveau complément alimentaire (la spiruline enrichie en silicium), préalablement à sa commercialisation, posséde ou non une éventuelle toxicité. Ensuite, les résultats obtenus nous ont conduit à étudier ses effets sur la pathologie athéromateuse, s'ils sont bénéfiques, et si l'enrichissement en silicium potentialise ces effets par rapport à la spiruline native.

Avant de mettre en œuvre l'étude principale de ces travaux de thèse, nous avons donc réalisé une étude de toxicité chronique de la spiruline enrichie en silicium (**Etude 1**), l'objectif de l'industriel étant de mettre ce produit sur le marché.

L'absence de toxicité ayant été démontré lors de l'**étude 1**, nous avons entrepris une seconde étude (**Etude 2)**. Pour ce travail, nous avons utilisé un modèle animal pour lequel nous avons induit nutritionnellement l'athérosclérose. La mise au point de ce modèle, à laquelle j'ai participé au sein de notre équipe, a permis la mise en évidence du développement de dépôts lipidiques aortiques. En effet, la présence de ces dépôts lipidiques est le critère principal retenu dans la validation du modèle (Romain et al., 2012). La dose de silicium administrée correspond à une dose de 40 mg de silicium / jour pour un homme, ce qui correspond à 0,57 mg / kg / jour. Ce travail permet d'avoir une vision d'ensemble sur les actions de ce produit et d'observer si celui-ci agit sur les multiples composantes liées à l'athérosclérose (lipidique, oxydative, inflammatoire et artérielle). Cette étude a fait l'objet d'un dépôt d'un brevet d'application **(Référence : 248012/D33755)**, relatif aux effets bénéfiques démontrés par la spiruline enrichie en silicium sur la pathologie cardiovasculaire.

Ce travail est donc organisé en trois parties :

- Evaluation d'une possible toxicité chronique chez le rat Sprague-Dawley.

- Mise au point du modèle animal d'athérosclérose.

- Effet d'un apport alimentaire de spiruline enrichie en silicium chez le hamster Syrien doré athéromateux.

Matériel & Méthodes

A Spiruline enrichie en silicium

Les spirulines, ainsi que les spirulines enrichies en silicium, sont produites par l'entreprise Phyco-Biotech (Lunel, 34400, France).

La souche de spiruline utilisée est Arthrospira *platensis*.
La culture est réalisée sous serre, en éclairage naturel avec des ouvrants facilitant le contrôle de la température, dans des bassins de 25 m^3, qui comprennent une cloison centrale permettant de faire circuler le milieu en circuit fermé. Celle-ci est menée en continu du mois d'avril jusqu'au mois de novembre. La croissance des spirulines a lieu dans le milieu Zarouk, milieu de référence pour les cyanobactéries **(Tableau 14)**. La température de la culture dans les bassins est comprise entre 30°C et 35°C. Afin de permettre un développement optimal et d'assurer une bonne répartition de l'éclairage au sein de la biomasse, le milieu est brassé grâce à des pompes, au nombre de quatre par bassin, ou par des roues à aubes.
Les algues sont récoltées tous les jours en fonction de leur densité, afin de ne pas mettre en péril l'ensemble de la culture. Cette quantité varie de 5 % à 15 % de la quantité totale de spiruline présente. La culture n'est donc jamais récupérée en totalité dans un bassin.
Les spirulines sont récoltées le matin sur une toile fine (40 µm) montée sur cadre. Les algues sont raclées puis pressées sous vide environ 15 minutes afin d'obtenir une pâte d'algues. Celle-ci sera placée dans une extrudeuse, puis mise sur des plaques dans une enceinte à une température de 40°C pendant 20 heures qui permet ainsi leur séchage. Enfin, les spirulines seront concassées et broyées en poudre avant d'être stockées pour réaliser ultérieurement les suspensions nécessaires pour les différentes études.

En ce qui concerne les spirulines enrichies en silicium, les procédés de culture et de récolte sont les mêmes, mis à part le fait que l'on ajoute, dans le milieu culture, du métasilicate de sodium (Na_2O_3Si). Le silicium est gardé en solution grâce à un procédé breveté, déposé le 8 avril 2014 **(Demande N°1453113)**. Les algues sont récoltées du 6ème jour au 10ème jour. Le silicium est dosé chaque jour et les lots sont mélangés pour obtenir 1 % de silicium (P/P) dans la spiruline.

Tableau 14 : *Composition du milieu Zarouk*

Ingrédients	g / L
$NaHCO_3$	16,8
K_2HPO_4	0,5
$NaNO_3$	2,5
K_2SO_4	1,0
NaCl	1,0
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,2
$CaCl_2$	0,04
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,01
EDTA	0,08
H_3BO_3	$2,86.10^{-3}$
$MnCl_2 . 4H_2O$	$1,81.10^{-3}$
$ZnSO_4 . 7H_2O$	$0,22.10^{-3}$
$CuSO_4 . 5H_2O$	$7,9.10^{-5}$
MoO_3	$1,5.10^{-5}$
Na_2MoO_4	$2,1.10^{-5}$

B Modèle animal

B.1 Choix du modèle

Pour mes travaux de recherches, deux modèles d'animaux ont été utilisés afin de répondre au mieux aux attentes des différentes études.

Pour l'**étude 1** qui porte sur l'évaluation de la toxicité de notre produit, le modèle choisi a été le rat Sprague-Dawley. Ce modèle est couramment utilisé pour les études toxicologiques.

Pour l'**étude 2**, relative au développement précoce de l'athérosclérose, le modèle animal choisi a été le hamster Syrien doré. Cet animal a suscité un intérêt en tant que modèle pour l'athérosclérose depuis qu'il développe des lésions artérielles lorsqu'il reçoit un régime

athérogène (Singhal et al., 1983; Nistor et al., 1987). Le hamster n'est pas naturellement résistant au développement des maladies cardiovasculaires, ce qui permet une induction nutritionnelle de la pathologie. Les LDL circulants des hamsters répondent aux graisses alimentaires d'une manière comparable à l'homme (Spady and Dietschy, 1985, 1988). De plus, il est très intéressant du fait de, (i) son métabolisme du cholestérol et des sels biliaires semblable à celui de l'homme (Spady and Dietschy, 1983; Spady et al., 1986a, 1986b), (ii) sa disposition naturelle au développement de la lésion athéromateuse précoce et (iii) sa manipulation aisée.

B.2 Traitement et suivi

Les rats Sprague-Dawley, utilisés pour l'**étude 1**, pèsent en moyenne entre 90 et 100 grammes au début; les hamsters Syriens dorés, utilisés pour l'**étude 2**, pèsent généralement entre 60 et 80 grammes en début d'expérience. Ces animaux proviennent de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Dès leur arrivée, ils sont hébergés au CECEMA (Centre d'Elevage et de Conditionnement Expérimental des Modèles Animaux, Université Montpellier 2), puis répartis au hasard en groupes et placés dans un environnement contrôlé, avec une température de 23°C ± 1°C, une hygrométrie de 70 % et une photopériode de 12 heures. Les animaux sont manipulés selon les directives du Comité du Soin Animal de l'Université Montpellier 2 et du NIH .

Ils ont libre accès à la nourriture et à l'eau. La consommation alimentaire est mesurée quotidiennement et le poids corporel des animaux est enregistré tous les deux jours.

B.2.1 Régime utilisé

Etude 1 : Un seul régime est utilisé et sa composition est identique à celle du régime standard utilisé lors de l'**étude 2**.

Etude 2 : Deux régimes ont été utilisés. Un régime athéromateux qui déclenche au mieux la pathologie athéromateuse et notamment le développement de stries lipidiques aortiques (Romain et al., 2012). Il correspond à un régime standard enrichi en lipides saturés apportés par de l'huile de coco hydrogénée et une faible addition de cholestérol. Ce régime n'est pas

carencé en antioxydants alimentaires, afin de refléter au mieux la réalité de la prise alimentaire chez l'homme.
Ensuite, un régime dit « régime standard » est utilisé comme contrôle négatif de la pathologie.

Ces deux régimes sont semi-purifiés et fabriqués selon nos recommandations par SAFE (Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France).

La composition des différents régimes est donnée dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : *Composition des régimes*

Ingrédients (g/kg)	Régime Standard	Régime Athéromateux
Caséine	236	200
L-Méthionine	3,5	3
Amidon de maïs	300	393
Maltodextrine	30	53
Saccharose	290,5	154
Cellulose	50	50
Huile végétale (colza, maïs)	45	/
Huile de coco hydrogénée	/	100
Cholestérol	/	2
Mélange minéral [1]	35	35
Mélange vitaminique [2]	10	10
Energie (Kcal/kg)	3845	4112
Energie lipidique (%)	**10,5**	**21,9**

[1]Le mélange minéral contient (mg/kg régime) : $CaHPO_4$, 17200 ; KCl, 4000 ; NaCl, 4000 ; MgO, 420 ; $MgSO_4$, 2000 ; Fe_2O_3, 120 ; $FeSO_4.7H_2O$, 200 ; éléments trace, 400 ($MnSO_4.H_2O$, 98 ; $CuSO_4.5H_2O$, 20 ; $ZnSO_4.7H_2O$, 80 ; $CoSO_4.7H_2O$, 0,16 ; KI, 0,32) ; amidon, qsp 35 g.

[2]Le mélange vitaminique contient (mg/kg régime) : rétinol, 12 ; cholécalciférol, 0,125 ; thiamine, 40 ; riboflavine, 30 ; acide pantothénique, 140 ; pyridoxine, 20 ; inositol, 300 ; cyanocobalamine, 0,1 ; ménadione, 80 ; acide nicotinique, 200 ; choline, 2720 ; acide folique, 10 ; acide *p*-aminobenzoïque, 100 ; biotine, 0,6 ; amidon qsp 10 g.

B.2.2 Gavage des animaux

Etude 1 : Pour cette étude, trois concentrations de spiruline enrichie en silicium ont été administrées. Une dose nutritionnelle, (57 mg / jour / kg) (voir explication **étude 2**), une dose deux fois plus faible (28,5 mg / jour / kg) et une dose cinq fois plus forte (285 mg / jour / kg). De plus, la spiruline brute a également été donnée à la dose cinq fois supérieure (285 mg / jour / kg), afin d'identifier la provenance d'une éventuelle toxicité.
Au cours de cette étude, les animaux recevront le traitement pendant 90 jours, car on se place dans une étude de toxicité chronique.

Etude 2 : Pour l'administration du silicium, nous nous sommes basés sur les références données par l'EFSA, c'est-à-dire 40 mg de silicium / jour pour un homme de 70 kg. Cela correspond donc à 0,57 mg / jour / kg de poids corporel de silicium. Sachant que les spirulines contiennent 1 % de silicium, cela revient donc à administrer une dose de spiruline enrichie en silicium de 57 mg / jour / kg. Ceci équivaut à un apport de spiruline de 5 g / jour approximativement, quantité recommandée quotidiennement.
Les spirulines brutes, c'est-à-dire les spirulines non enrichies en silicium, seront administrées à la même concentration, 57 mg / kg / jour.
Au cours de cette étude, les animaux seront gavés pendant 12 semaines.

Les spirulines enrichies ou non sont préparées en solution dans de l'eau distillée et le volume administré par gavage est ajusté quotidiennement en fonction du poids des animaux.
Le gavage se pratique par l'injection de la solution directement dans l'œsophage des animaux à l'aide d'une sonde métallique montée sur une seringue à usage unique. Le gavage est réalisé tous les matins, à horaire fixe afin de ne pas perturber les animaux.
Les animaux sont supplémentés dès le début de l'étude, ce qui permet d'avoir un modèle d'étude préventif de la pathologie.
Enfin, les animaux témoins, non traités aux spirulines, reçoivent quotidiennement de l'eau par gavage. Ceci permet d'éviter le biais du gavage, qui peut induire un stress.

C Prélèvement du sang et des tissus

En fin d'expérimentation, les animaux sont placés une nuit à jeun puis anesthésiés le lendemain matin par injection intra-péritonéale de pentobarbital **(étude 1 & 2)**.

Pour l'**étude 1**, le sang prélevé par ponction intracardiaque est réparti dans deux tubes, un hépariné et l'autre non, afin de réaliser le jour même les analyses biochimique et hématologique. Pour l'**étude 2**, le sang est prélevé par ponction intracardiaque à l'aide d'une seringue héparinée puis immédiatement centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes. Le plasma obtenu est congelé à -80°C.

L'appareil vasculaire de l'animal est rincé *in situ* par perfusion d'environ 30 mL d'une solution de tampon phosphate contenant du chlorure de calcium (1 mM) et 0,27 % de glucose (PBS). La perfusion se fait lentement en utilisant le point de ponction cardiaque comme voie d'entrée, une voie de sortie étant aménagée au niveau de l'aorte abdominale **(étude 1 & 2)**.

Le foie est ensuite excisé et rincé dans une solution de chlorure de sodium 0,15 M. Il est alors débarrassé de la vésicule biliaire (pour le hamster), puis essoré sur du papier absorbant et pesé. Un lobe déterminé est fixé dans un tampon neutre de formaline 10 % pour l'analyse histologique. Le reste du foie est séparé en morceaux qui sont conservés au -80°C jusqu'aux analyses **(étude 1 & 2)**.

Chez les animaux utilisés pour la détermination de la réactivité vasculaire, l'aorte est détachée de la colonne vertébrale à partir du cœur. Le tissu isolé est alors immergé dans du milieu PSS (Solution Saline Physiologique) et le cœur est éliminé. Ensuite, le tissu conjonctif entourant l'artère est retiré. Le milieu PSS est préparé à partir du milieu 10X contenant du NaCl (140 mM), du KCl (5 mM), du $MgCl_2$ (1 mM), du KH_2PO_4 (0,5 mM), du NaH_2PO_4 (0,5 mM), de l'HEPES (10 mM) et du $CaCl_2$ (2,5 mM) qui est dilué au 1/10e dans lequel du glucose (11 mM) est ajouté. La solution finale est à pH 7.4. L'analyse se fait sur des échantillons frais **(étude 2)**.

Le cœur est prélevé, rincé dans du tampon KREBS (pH 7.4), séché et pesé. Ensuite, le ventricule gauche est disséqué, pesé et conservé à -80°C jusqu'aux analyses **(étude 2)**.

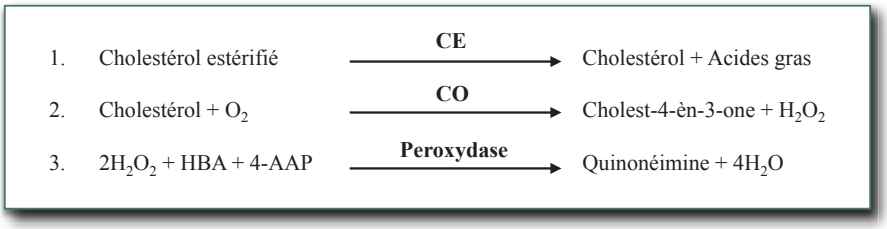
En plus du cœur et du foie, d'autres organes tels que les reins et la rate sont prélevés, séchés et pesés **(étude 1)**.

D *Paramètres biochimiques sanguins*

Les mesures d'hématologie et de biochimie sanguine au cours de l'**étude 1** (étude de toxicité chronique de la spiruline enrichie en silicium) ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire d'analyses médicales ICHRI (Montpellier, France).

D.1 Cholestérol plasmatique total

La mesure du cholestérol plasmatique total est réalisée selon la méthode d'Allain et al., (1974). Elle utilise une technique enzymatique colorimétrique en point final et se fait grâce à un kit commercial (CHSL-0500, Elitech Group, Puteaux, France) sur un automate Pentra 400 (HORIBA ABX, Montpellier, France).
Le principe du dosage est le suivant :



Le cholestérol estérifié subit une hydrolyse enzymatique par la cholestérol estérase (CE) pour former du cholestérol et des acides gras libres (1). La cholestérol oxydase (CO) oxyde le cholestérol en cholest-4-èn-3-one et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (2). L'H_2O_2 produit se combine avec l'acide hydrobenzoïque (HBA) et la 4-aminoantipyrine (4-AAP) pour former la quinonéimine colorée (chromophore) *via* la peroxydase, dont l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en cholestérol de l'échantillon.

Le milieu réactionnel est composé d'un tampon phosphate 53 mM à pH 6,6 contenant 100 U/L de CE, 1250 U/L de CO, 800 U/L de peroxydase, de la 4-AAP (250 mM) et de l'HBA (10 mM).

Le plasma à tester est ajouté avec un ratio de 100 volumes de réactif pour un volume de plasma et le mélange est incubé à 37°C pendant 5 minutes, afin de permettre le déroulement des réactions enzymatiques. L'absorbance est lue à 500 nm. Une solution standard de cholestérol de concentration connue (2 g/L) est utilisée comme référence. La concentration en cholestérol est calculée selon :

Cholestérol (g/L) $_{\text{échantillon}}$ **= Absorbance** $_{\text{échantillon}}$ **/ Absorbance** $_{\text{étalon}}$ **x Concentration** $_{\text{étalon}}$ **(g/L)**

D.2 Cholestérol plasmatique lié aux HDL

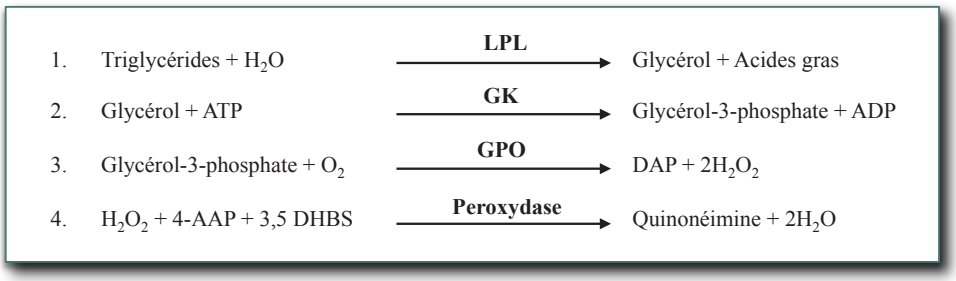
La détermination du cholestérol-HDL nécessite sa séparation des autres lipoprotéines plasmatiques (LDL et VLDL) qui se fait selon la procédure de Burstein et al., (1970) en utilisant un kit commercial (HDLC-0060, Elitech Group, Puteaux, France).
Le milieu réactionnel est composé de l'acide phosphotungstique (30,3 mM) et de chlorure de magnésium (100 mM) permettant la précipitation sélective des lipoprotéines à Apo B, de faible densité (LDL et VLDL).
Le plasma est ajouté au réactif pour un ratio de 10/1. Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé à 5000 tours/minute pendant 15 minutes.
Le surnageant, ne contenant que le cholestérol-HDL, est récupéré et soumis à une mesure du cholestérol selon la même méthode que celle utilisée pour la détermination du cholestérol plasmatique total.

La concentration plasmatique en cholestérol porté par les VLDL étant négligeable, la concentration en cholestérol-LDL peut être déduite selon la formule suivante :

Cholestérol-LDL (g/L) $_{\text{échantillon}}$ **= Cholestérol total (g/L)** $_{\text{échantillon}}$ **- Cholestérol-HDL (g/L)** $_{\text{échantillon}}$

D.3 Triglycérides plasmatiques

La mesure des triglycérides plasmatiques est basée selon la procédure de Fossati and Prencipe, (1982). Elle utilise une technique enzymatique colorimétrique en point final et se fait grâce à un kit commercial (TGML-0515, Elitech Group, Puteaux, France).
Les réactions enzymatiques mises en jeu sont les suivantes :



Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol et acides gras libres par action de la lipoprotéine lipase (LPL) (1). Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) avec la glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP) (2). Le glycérol-3-phosphate est oxydé en dihydroxy-acétone phosphate (DAP) *via* la glycérol-3-phosphate-oxydase (GPO), avec production d'H_2O_2 (3). Sous l'action de la peroxydase, H_2O_2 réagit avec la 4-AAP et le 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène (DHBS) pour produire la quinonéimine (4) qui absorbe à 500 nm.

Le milieu réactionnel est constitué d'un tampon phosphate 53 mM à pH 7 contenant 31000 U/L de LPL, 6000 U/L de GPO, 5400 U/L de peroxydase et 560 U/L de GK, de l'ATP (2,5 mM), de la 4-AAP (0,8 mM) et du 3,5 DBHS (1 mM).

La réaction est initiée en mélangeant le réactif au plasma avec un ratio de 100/1. Le mélange est incubé 5 minutes à 37°C et l'absorbance est lue à 500 nm. Un standard glycérol à 2 g/L est utilisé comme étalon pour connaitre la concentration en triglycérides de l'échantillon.

La valeur de la concentration en triglycérides de l'échantillon est obtenue selon :

Triglycérides (g/L) $_{\text{échantillon}}$ **= Absorbance** $_{\text{échantillon}}$ **/ Absorbance** $_{\text{étalon}}$ **x Concentration** $_{\text{étalon}}$ **(g/L)**

D.4 Activité de la paraoxonase plasmatique

L'activité de la paraoxonase-1 (PON-1) est déterminée selon la méthode de Jaouad et al. (2006) et consiste à suivre l'hydrolyse du paraoxon dont le principe est le suivant :

$$\text{Paraoxon} + H_2O \xrightarrow{\textbf{PON-1}} \text{Paranitrophénol} + \text{diéthylphosphate}$$

Le milieu réactionnel se compose d'un tampon Tris-HCl (100 mM) à pH 8,0 contenant du $CaCl_2$ (2 mM) et du paraoxon (5,5 mM). Le plasma est ajouté au réactif selon un ratio de 1/20. La réaction est suivie à température ambiante pendant 5 minutes et la pente, soit le $\Delta DO.min^{-1}$, est mesurée. Une unité d'activité de la paraoxonase correspond à la libération d'une nanomole de paranitrophénol / min à 25°C et 412 nm.

D.5 Glucose plasmatique

Le dosage du glucose plasmatique est réalisé grâce à la méthode de Trinder (1969). Elle utilise une technique enzymatique colorimétrique en point final et se fait grâce à un kit commercial (Glucose RTU-21270, Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France).
Le principe est le suivant :

1. $\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\textbf{Glucose Oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$
2. $2H_2O_2 + \text{Phénol} + \text{4-AAP} \xrightarrow{\textbf{Peroxydase}} \text{Quinonéimine} + 4H_2O$

En présence d'O_2, le glucose est oxydé en acide gluconique et en H_2O_2 *via* la glucose oxydase (1). L'H_2O_2 produit se combine avec le phénol et la 4-aminoantipyrine (4-AAP) pour former la quinonéimine *via* la peroxydase, dont l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon.

Le réactif de dosage est constitué d'un tampon phosphate (225 mM) pH 6,6 contenant de la 4-AAP (0,3 mM), du phénol (8,5 mM), de l'EDTA (5 mM), de la peroxydase à 300 U/L et de la glucose oxydase à 10000 U/L.

La réaction est initiée en mélangeant le plasma au réactif avec un ratio de 1/100. Le mélange est incubé 10 minutes à 37°C et l'absorbance est lue à 505 nm. Un standard glucose à 1 g/L est utilisé comme étalon pour connaitre la concentration en glucose de l'échantillon.

La valeur de la concentration en glucose de l'échantillon est obtenue par le calcul suivant :

Glucose (g/L) $_{\text{échantillon}}$ = Absorbance $_{\text{échantillon}}$ / Absorbance $_{\text{étalon}}$ x Concentration $_{\text{étalon}}$ (g/L)

D.6 Insuline plasmatique

La concentration plasmatique en insuline a été déterminée en utilisant la méthode ELISA avec un kit commercial (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

La mesure repose sur une méthode immunologique ELISA en sandwich qui permet de détecter une protéine d'intérêt au sein d'un échantillon et de la quantifier. Un anticorps de capture, dirigé contre la protéine d'intérêt, est lié dans les puits d'une microplaque. Le plasma est ajouté dans chacun des puits et les protéines recherchées se lient à cet anticorps. Un second anticorps, dit de détection, dirigé contre la protéine d'intérêt et couplé à une enzyme (peroxydase) est ajouté sur la microplaque. Finalement, le substrat de l'enzyme est ajouté (tetramethylbenzidine) et sera converti par la peroxydase en une forme colorée, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de la protéine plasmatique évaluée, détectable par spectrophotométrie à 450 nm. Une courbe d'étalonnage est produite avec des standards de concentration connue.

L'insulino-résistance a également été évaluée, en utilisant l'index HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-estimated Insulin Resistance) développé par Matthews et al. (1985). Cet index a été validé par de nombreuses études cliniques et épidémiologiques et montre une bonne corrélation avec la méthode de clamp euglycémique, qui est difficile à mettre en place .

L'HOMA-IR a été estimé selon la formule suivante :

HOMA-IR = [Glycémie à jeun (mmol/L) x Insulinémie à jeun (mU/L)] / 22,5

E Paramètres oxydatifs

E.1 Activité de la NADPH oxydase cardiaque et hépatique

L'activité de la NADPH oxydase est estimée par la mesure de la production d'anion superoxyde ($O_2°^-$) dans des homogénats des tissus hépatique et cardiaque.

E.1.1 Préparation des fractions cytosoliques

Le foie et le ventricule gauche sont broyés dans du tampon de KREBS (100 mg de tissu pour 1 mL de tampon). Le tissu est broyé à l'Ultraturax dans de la glace (20 secondes), puis l'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 20 minutes à 4000 g.
Le surnageant est récupéré (dilution au 1/50e pour le tissu hépatique) et aliquoté pour le dosage des protéines. La mesure de la production d'anion superoxyde se fait sur des homogénats frais.

E.1.2 Quantification des protéines

La concentration en protéines dans les homogénats de foie et de ventricule gauche est mesurée selon la méthode de Bradford (1976). C'est un dosage colorimétrique, basé sur le variation d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie (marron avant la liaison et bleu après) après liaison avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes. L'absorbance est évaluée à 595 nm.
Chaque mesure est effectuée en triple et la concentration protéique (mg/mL) est déterminée par rapport à une gamme de BSA.

E.1.3 Chimioluminescence

Afin de déterminer la production totale d'anion superoxyde par les différents tissus, nous avons utilisé la méthode de chimioluminescence à la lucigénine .

Cette méthode permet une mesure de la production totale d'anion superoxyde par la NADPH oxydase en utilisant une sonde bioluminescente spécifique de cet anion superoxyde, la lucigénine. En présence d'anion superoxyde, la lucigénine passe d'un état fondamental à un état excité. Lors de son retour à l'état fondamental, la lucigénine émet des photons. La quantité de photons émise est proportionnelle à la formation d'anion superoxyde. L'intensité de la luminescence (R.L.U., Relative Lights Units) est enregistrée par un luminomètre (Perkin Elmer Wallac, Victor, Turku, Finland).

Succinctement, dans une microplaque de 96 puits, l'homogénat tissulaire est mis en présence de NADPH (100 µM), substrat de la NADPH oxydase, et de lucigénine (10 µM). La production d'anion superoxyde est enregistrée pendant 30 minutes.
Cette production d'anion superoxyde est également mesurée sur un puits témoin négatif, qui ne contient pas de NADPH, afin d'évaluer la production basale d'anion superoxyde et de la soustraire à la mesure réalisée. La production d'un témoin positif, pour lequel est ajouté le DPI (diphényliodonium), inhibiteur de la NADPH oxydase, est également enregistrée.
Concernant le tissu cardiaque, un inhibiteur de la SOD, le cyanure (5 mM), est ajouté dans les puits afin d'obtenir un signal enregistrable, puisque la SOD protège fortement le cœur de l'oxydation.

Les résultats obtenus sont rapportés à la concentration en protéine du tissu concerné et exprimés en RLU / µg de protéines.

E.2 Activité des TBARS

La peroxydation lipidique est analysée par la mesure de l'activité des TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species). En condition acide (pH 2.0) et à température élevée (100°C), le malondialdéhyde (MDA) et les autres produits aldéhydiques réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe rose qui à une absorption maximum à 532 nm. La méthode du dosage est basée selon la méthode de Sunderman et al. (1985). Les bruits de fond sont corrigés à 508 et 556 nm, selon la correction d'Allen (1950).

E.2.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques

Le foie est broyé dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7.0 à raison de 0,5 g de tissu pour 4,5 mL de tampon. Le tissu hépatique est broyé 20 secondes à l'Ultraturax dans la glace. L'homogénat est ensuite récupéré afin de réaliser la mesure de l'activité des TBARS et stocké à -80°C.

E.2.2 Mesure de l'activité des TBARS hépatiques

Les homogénats de foie sont incubés pendant 1 heure à 100°C en présence d'une solution de KCL (154 mM), H_3PO_4 (1%) et de TBA (30 mM). Ceci permet la décomposition des peroxydes lipidiques en produits secondaires, donc la production de MDA, et ainsi conduire à la production de TBARS.
Le tube est alors refroidi dans la glace. On ajoute du butanol (2 mL) dans chaque tube. Les tubes sont agités pendant 30 secondes puis centrifugés à 3500 g pendant 15 minutes à température ambiante. La phase, de coloration rose, est ensuite récupérée afin de mesurer l'absorbance à 535 nm par spectrophotométrie.
Les résultats sont exprimés en nmole TBARS / g de tissu frais.

E.3 Activité des enzymes antioxydantes hépatiques

E.3.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques

La préparation des fractions cytosoliques hépatiques a été préparée de deux manières différentes en fonction des deux études.
Dans l'**étude 1**, les mesures de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx), de la catalase (CAT) et des groupements thiols (SH) ont été réalisées. En ce qui concerne l'**étude 2**, seules les activités de la SOD et de la GPx ont été déterminées.

Etude 1 : Le foie est broyé dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7.0 à raison de 0,5 g de tissu pour 4,5 mL de tampon. Le tissu hépatique est broyé 20 secondes à l'Ultraturax dans la

glace. L'homogénat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 3500 g. Le surnageant est prélevé et stocké à -80°C jusqu'aux différentes analyses.

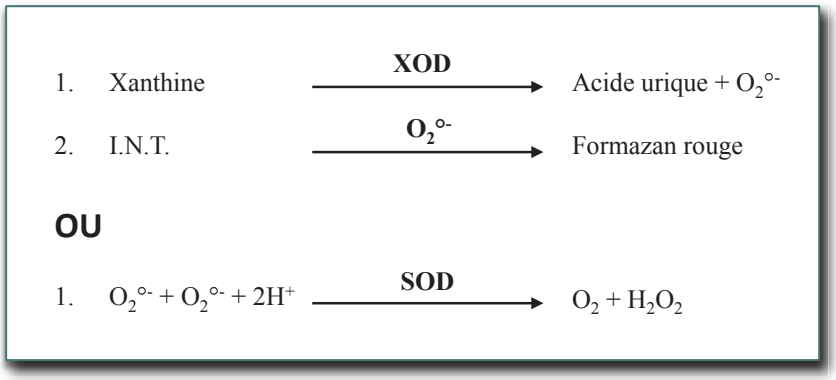
Etude 2 : Une portion de foie (100 mg) est homogénéisée, dans de la glace, en présence de 1 mL de tampon phosphate de potassium (0,1 M) pH 7.4 à l'aide d'un broyeur Ultraturax. L'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 30 minutes et à 13 000 g. Le surnageant récupéré subit une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions. A la suite de cette dernière, le surnageant est récolté puis stocké à -80°C jusqu'aux analyses.
Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford.

E.3.2 Mesure de l'activité de la superoxyde dismustase (SOD)

Etude 1 : Le pyrogallol est reconnu pour sa rapide auto-oxydation, spécialement dans les solutions alcalines. Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l'$O_2^{\circ -}$ et la dismutation de l'$O_2^{\circ -}$ par la SOD (Marklund and Marklund, 1974; Marklund, 1976).
Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50 % de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage.

Pour ce dosage, l'homogénat de foie est dilué au 1/26e. L'échantillon sera déposé dans une cuve en quartz en présence de tampon Tris-acide cacodylique (50 mM de Tris) contenant 1 mM d'acide acétique diethylenetriaminepenta (DTPA), pH 8.2 et de pyrogallol (6 mM). La réaction se déroule à 30°C. La DO est suivie à 320 nm pendant 30 secondes. Des solutions étalons avec différentes concentrations connues en SOD sont utilisées pour la gamme.
L'activité de la SOD est exprimée en Unités d'activité / mg de protéines.

Etude 2 : L'activité de la SOD hépatique est mesurée en utilisant un kit commercial Ransod SD-125 (Randox laboratories LTD, UK).
Le rôle de la SOD est de permettre la dismutation de l'anion superoxyde, produit pendant le processus d'oxydation, en oxygène moléculaire (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase (XO) pour générer l'anion superoxyde (1), lequel va réagir avec le 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phényltétrazolium chloride (I.N.T.) pour former le formazan rouge (2).

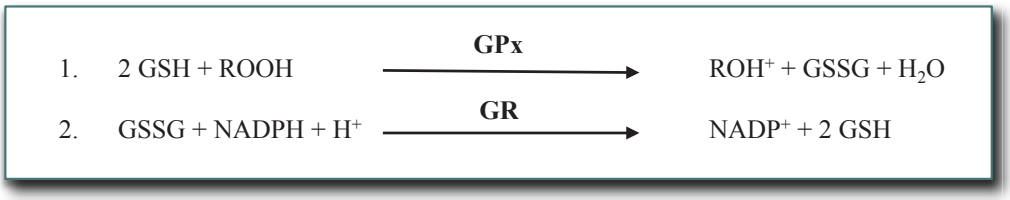


L'activité de la SOD est déterminée par le degré d'inhibition de cette réaction, observée durant 3 minutes à 505 nm. Une unité de SOD diminue de 50 % la vitesse de réduction de l'I.N.T. dans les conditions expérimentales.
Le pourcentage d'inhibition est rapporté en Unités d'activité / mg de protéines.

E.3.3 Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Etude 1 : Le principe est identique à l'**étude 2**, mis à part que la mesure de l'activité de la GPx ne se fait pas avec un kit commercial mais selon la méthode de (Flohé and Günzler, 1984).
L'homogénat de foie est dilué au 1/11e. L'échantillon est déposé dans une cuve dans laquelle est ajoutée du tampon phosphate (50 mM) contenant du DTPA (0,5 mM) à pH 7.0, de la GSH (100 mM), de la GRx (5 U/mL), du NADPH (2,4 mM) et de l'hydroperoxyde de ter-butyle (t-BHP) (50 mM). La réaction se déroule à 30°C. Après un délai de 30 secondes, l'absorbance est lue pendant 1 minute à 340 nm.
Une unité de GPx est la quantité qui oxyde 1 µmol de GSH par minute.
L'activité de la GPx est exprimée en mUnités d'activité / mg de protéines.

Etude 2 : L'activité de la GPx hépatique est déterminée avec un kit commercial Ransel RS-505 (Randox laboratories LTD, UK) selon la méthode de Paglia and Valentine (1967).
La GPx catalyse l'oxydation du glutathion (GSH) par l'hydroperoxyde de cumène (ROOH) (1). En présence de la glutathion réductase (GR) et de NADPH, le glutathion oxydé (GSSG) est converti sous sa forme réduite avec l'oxydation concomitante du NADPH en $NADP^+$ (2).

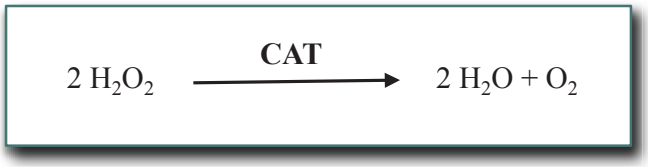


La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm.
Les valeurs sont rapportées en Unités d'activité / mg de protéines.

E.3.4 Mesure de l'activité de la catalase (CAT)

Les homogénats de foie sont réalisés selon le procédé de l'**étude 1**.
Le dosage de protéines s'effectue selon la méthode de Bradford.

La mesure d'activité de la CAT repose sur le principe de Beers and Sizer (1952).
L'enzyme catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en molécule d'eau (H_2O) selon l'équation suivante :



L'homogénat de foie est dilué au 1/51e. L'échantillon de foie est déposé dans une cuve en présence d'un tampon phosphate (50 mM) pH 7.0 et d'une solution d'H_2O_2 (30 mM). La diminution de l'absorbance qui correspond à la disparition de l'H_2O_2, est suivie pendant 1 minute à 240 nm après un délai de 30 secondes.
L'activité de la CAT est exprimée en Unités d'activité / mg de protéines.

E.3.5 Mesure de l'activité des groupements thiols (SH)

Les homogénats de foie sont réalisés selon le procédé de l'**étude 1**.
La mesure des groupements thiols a été réalisée par la méthode colorimétrique basée sur la technique de Jocelyn (1987).

Le dosage utilise le DNTB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman). Le groupement SH réduit le DTNB en acide 5-thio (2-nitrobenzoïque) (TNB), coloré en jaune, possédant une absorbance importante à 412 - 415 nm.

L'échantillon, dilué au 1/20e, est déposé dans une cuve dans laquelle est ajouté du tampon phosphate (20 mM) contenant de l'EDTA (1 mM), pH 8.0. L'absorbance des échantillons est mesurée à 412 nm en présence ou non du réactif d'Ellman (10 mM). Une gamme étalon d'albumine, de 0 à 20 mg/mL, est réalisée.
La quantité de groupements SH est calculée en considérant le poids moléculaire de l'albumine et son contenu en -SH (0,66 mole de SH par mole d'albumine).
La quantité de groupements thiol est exprimée en nmol / mg de protéines.

F Paramètres inflammatoires

F.1 Concentration plasmatique en MCP-1

La concentration de la cytokine pro-inflammatoire, Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) a été déterminée dans le plasma grâce à un kit commercial (MJE00, R&D Systems, Lille, France). Le dosage repose sur la méthode ELISA en sandwich qui permet de détecter une protéine d'intérêt au sein d'un échantillon et de la quantifier (même technique utilisée précédemment pour la mesure de l'insuline). L'absorbance est lue à 450 nm et une courbe d'étalonnage est définie avec des standards de concentrations connues.

F.2 Concentration hépatique en TNF-α et IL-6

F.2.1 Préparation des fractions cytosoliques hépatiques

Le tissu hépatique est homogénéisé dans un tampon Tris-HCl (10 mM) à pH 7.4, contenant du NaCl (0,1 M), de l'EDTA (1 mM), 0,05 % de Tween 80 et du PMSF (Phénylméthylsulfonyl fluoride) (1 mM). L'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 30 minutes à 9000 g puis le surnageant est stocké à -20°C jusqu'aux analyses.

La concentration en protéines de l'homogénat est déterminée par la méthode de Bradford.

F.2.2 Mesure de la production en TNF-α et IL-6 hépatiques

La concentration en cytokines pro-inflammatoires, TNF-α et IL-6, est déterminée par la technique ELISA en sandwich à l'aide de kits commerciaux (DY510 pour TNF-α et DY506 pour IL-6, R&D Systems, Lille, France). L'absorbance est lue à 450 nm et une courbe d'étalonnage est déterminée avec des standards de concentrations connues pour les deux cytokines.
Les échantillons de foie sont dilués au 1/5e pour la détermination des deux cytokines.
Les résultats sont exprimés en ng / µg de protéines.

F.3 Activité hépatique du NF-κB

F.3.1 Préparation des fractions nucléaires hépatiques

Pour mesurer l'activité hépatique en NF-κB il faut récupérer la fraction nucléaire et non la fraction cytosolique.
Le tissu hépatique est homogénéisé, dans la glace, dans un tampon de broyage constitué d'HEPES (20 mM) pH 7.9, d'EDTA (10 mM), de KCl (10 mM) et de 1 % de cocktail inhibiteur de protéases. Après 15 minutes d'incubation dans la glace, l'homogénat est centrifugé à 850 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu qui correspond à la fraction cytoplasmique est éliminé. Le culot est à nouveau suspendu dans le tampon de broyage, puis incubé 15 minutes dans la glace. 50 µL d'Igepal (détergent) sont ajoutés, permettant une lyse efficace des cellules. L'échantillon subit une nouvelle centrifugation à 4°C pendant 30 secondes à 14 000 g afin d'éliminer le cytoplasme résiduel. Le culot qui ne contient que la fraction nucléaire est conservé.
Ce culot est suspendu dans un tampon de lyse afin de libérer les protéines présentes dans les noyaux cellulaires. Ce tampon de lyse est constitué d'HEPES (20 mM) pH 7.9, d'EDTA (1 mM), de NaCl (200 mM), de 10 % de glycérol, de DTT (1 mM) et de 1 % de cocktail d'inhibiteur de protéases. Après une incubation de 30 minutes dans la glace sur une plateforme agitée, le culot est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 14 000 g. Le culot qui

contient les débris nucléaires est éliminé et le surnageant, contenant la fraction nucléaire, est conservé à -80°C jusqu'aux analyses.
La concentration en protéines de la fraction nucléaire contenue dans chaque échantillon est mesurée par la méthode de Bradford.

F.3.2 Mesure de l'activité du NF-κB hépatique

L'activité hépatique de NF-κB est déterminée par la technique ELISA grâce à un kit commercial (TransAM™ NF-κB p65/p50/p52, Active Motif, Rixensart, Belgique). Une protéine recombinante est utilisée pour établir une gamme étalon et quantifier l'activité du NF-κB dans nos échantillons.
Les résultats sont exprimés en ng / µg de protéines.

G Réactivité vasculaire

G.1 Préparation des échantillons et montage

L'aorte thoracique est utilisée pour étudier *ex vivo* les réponses aux agonistes ou aux antagonistes de la contraction artérielle. Après avoir récupéré l'aorte, celle-ci est immergée dans un milieu PSS (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, NaH_2PO_4 0,5 mM, HEPES 10 mM et $CaCl_2$ 2,5 mM, dilué au 1/10e dans lequel est ajouté du glucose 11 mM) à pH 7.4. Le tissu aortique est nettoyé, (graisses et tissus conjonctifs sont enlevés), puis coupé en anneaux de 2-3 mm de diamètre. Les anneaux aortiques sont montés dans des cuves spéciales de bain d'organe (EMKA Technologies, Paris, France), maintenu à 37°C et sous barbotage continuel d'O_2. A ce stade, les structures sont prêtes à être utilisées en vue de mesures de tensions isométriques.

G.2 Détermination de la contractilité de l'artère

Chaque anneau aortique est soumis durant 60 minutes à une tension basale optimale de 1 g, qui correspond à un état d'équilibre.

Deux tests préliminaires sont mis en place afin de vérifier l'intégrité et la fonctionnalité des anneaux : la fonction contractile de chaque anneau est évaluée avec 1 µM de phényléphrine (PE) ; la présence d'endothélium est confirmée par l'induction de la vasorelaxation après ajout d'acétylcholine (ACh, 1µM).

Après plusieurs rinçages et une période de stabilisation d'environ 20-30 minutes, des effets doses de l'agoniste PE (de 0,01 à 10 µM) sont évalués.

La fonction endothéliale est mesurée en étudiant les effets relaxants de différentes concentrations d'ACh (de 1 nM à 10 µM) sur les anneaux préalablement contractés par une concentration active maximale de PE (10 µM).

Sur des anneaux dépourvus d'endothélium, les relaxations sont déterminées grâce au Sodium NitroPrusside (SNP, 1 nm à 100 µM). Les anneaux, comme précédemment, sont au préalable contractés avec la PE (10µM).

Chaque protocole est réalisé en triple.

H Histologie hépatique

L'analyse histologique des foies a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire d'Anatomie Pathologique (CHU Gui de Chauliac, Montpellier, Dr. Jeanne. Ramos).

Les échantillons de foie sont fixés dans un tampon neutre de formaline 10 %, déshydratés par de l'alcool à degrés croissants puis inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm sont réalisées sur un microtome puis colorées à l'hématoxyline / éosine, colorant respectivement les noyaux et les membranes cellulaires. Les atteintes hépatiques telles que la stéatose et les infiltrations inflammatoires sont ensuite évaluées.

I Analyses statistiques

Les valeurs présentées sont les moyennes ± SEM (Erreur Standard à la Moyenne). La significativité entre les moyennes a été établie par analyse de la variance (test ANOVA), utilisant le test de Fisher à l'aide du logiciel Statview 5.0 (Abacus Concept, Inc, Berkeley, CA). Dans chaque figure et tableau de résultats et pour un même paramètre, les valeurs ou les

barres d'histogramme affectées d'une même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes pour $p < 0,05$.

Résultats expérimentaux

A Etude 1 : Evaluation d'une potentielle toxicité chronique de la spiruline enrichie en silicium chez le rat Sprague-Dawley

A.1 But de l'étude 1

La société Phyco-Biotech a produit de la spiruline enrichie en silicium afin de rendre le silicium biodisponible et hautement assimilable pour l'homme. Ce procédé fait l'objet d'un dépôt de brevet car c'est la première fois que l'on retrouve le silicium sous une telle forme.
De ce fait, aucune recherche de toxicité n'a été réalisée sur ce produit. Cependant de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la spiruline n'avait aucun effet toxique et qu'elle ne relâchait aucunes toxines (Chamorro et al., 1988; Yang et al., 2011). Concernant le silicium, les avis divergent sur la toxicité de celui-ci. Des travaux n'ont révélé aucune toxicité de nanoparticules de silice *in vivo* et *in vitro* (Buesen et al., 2014; Horie et al., 2014). Néanmoins d'autres études ont démontré que cette silice présente une toxicité, avec une activité pro-oxydante et pro-inflammatoire (Boudard et al., 2014; Skuland et al., 2014).
Le but de notre travail a donc été de vérifier que la spiruline enrichie en silicium ne présente pas un caractère toxique.
Pour cela, trois doses (28,5 ; 57 et 285 mg / spiruline enrichie en silicium / jour) ont été administrées par voie orale à des rats Sprague-Dawley pendant 90 jours. Deux autres groupes nous ont servi de contrôle, un groupe recevant uniquement de l'eau et un groupe recevant de la spiruline non enrichie à la forte dose (285 mg / spiruline non enrichie / jour). A l'issu du traitement, les rats ont été sacrifiés et un bilan biochimique et hématologique a été réalisé sur le sang des animaux. Les statuts oxydatifs et inflammatoires hépatiques ont également été évalués afin de vérifier l'absence d'effet pro-oxydant ou pro-inflammatoire de la spiruline enrichie en silicium.

A.2 Article 1

Article accepté, Food and Chemical Toxicology, Février 2015.

Food and Chemical Toxicology 80 (2015) 108–113

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Assessment of potential toxicological aspects of dietary exposure to silicon-rich spirulina in rats

Joris Vidé [a], Cindy Romain [a], Christine Feillet-Coudray [b], Béatrice Bonafos [b], Jean Paul Cristol [a], Gilles Fouret [b], Jean-Max Rouanet [a,1], Sylvie Gaillet [a,b,1,*]

[a] Nutrition & Metabolism, UMR 204 NUTRIPASS, Prevention of Malnutritions & Linked Pathologies, University of Montpellier, Place Eugène Bataillon, Montpellier 34095, France
[b] UMR 866 – Dynamic Muscle & Metabolism, INRA Montpellier Center, 2 Place Viala, Montpellier 34060, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 January 2015
Accepted 24 February 2015
Available online 14 March 2015

Keywords:
Toxicity
Silicon
Spirulina
Rats
Oxidative status
Inflammation

ABSTRACT

Silicon has beneficial effects especially on bones and skin and is important in cardiovascular pathophysiology. Furthermore, in spontaneously hypertensive rats, it reduces hypertension and increases antihypertensive and antiatherogenic gene expressions in the aorta. Thus, incorporating silicon into spirulina could be a way to produce a bioavailable food supplement.

The potential toxic effects of silicon-rich spirulina (SES) through haematological and biochemical parameters and inflammatory and oxidative status were evaluated in rats' blood and liver tissue. The study consisted in a 90-day experiment on female and male rats supplemented with three doses (28.5, 57 and 285 mg/kg BW/day) of SES. No mortality, abnormal clinical signs, behavioural changes or macroscopic findings were observed whatever the groups. Haematological parameters were not modified in SES treated-groups. No marked change was recorded in biochemical parameters The liver endogenous antioxidant enzymes (SOD, GPx, catalase) activities were not modified whatever the gender and the dose, just as markers of oxidative stress ($O_2^{\circ-}$, TBARS, thiols) and inflammation such as IL-6 and TNF-alpha.

Our findings indicate that dietary supplementation of silicon-rich spirulina on rats has no harmful side nor toxic effects and could be beneficial especially in the case of suspicion or installation of pathologies due to oxidative stress.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Silicon is a very important element in the living world (Exley, 1998). It is soluble essentially in the form of orthosilicic acid $Si(OH)_4$ in the surface waters. But beyond 2 mM and at neutral pH, this acid polymerizes into various forms of silica (colloidal solid) (Refitt et al., 2003) little or no soluble. At biological pH, silicon chemistry in solution mainly relates orthosilicic acid (Knight and Kinrade, 2001) which can form stable complexes with molecules containing hydroxyl groups (Ingri, 1978). Silicon has been identified associated with various biomolecules including proteins and carbon hydrates (Bond and McAuliffe, 2003). Silicon is indispensable for cell growth and trophic tissues in humans as in animals, and as such it is an essential element. Its digestive absorption is a function of its chemical presentation. Naturally, silicon is essentially in insoluble form, so poorly available (mineral silicon). On the other hand, even in a soluble form, silicon is slightly stable because it tends to polymerize rapidly at high concentration, which is the case of orthosilicic acid $Si(OH)_4$ which is the more soluble form of silicon and which has the better bioavailability (Calomme and Vanden Berghe, 1997; Jugdaohsingh et al., 2002), although it remains in a mineral form.

The silicon absorption in humans is largely performed in the form of orthosilicic acid $Si(OH)_4$ found in the drinking water or formed after food hydrolysis through the digestive tract (Refitt et al., 1999). The bulk of the silicon being in the form of colloidal silica is poorly absorbed by the body. In humans, daily intake is about 20–50 mg and the body needs 5–6 mg/day (Anonymous, 2004).

Biological importance of silicon has to be considered in the context of its body distribution. The highest concentrations are found in bone and connective tissues such as aorta, trachea, tendons and skin, where silicon appears as an actor in turnover processes through collagen and elastin synthesis (Seaborn and Nielsen, 1993). Silicon supplementation has been reported to have beneficial effects on these tissues and especially bones (Jugdaohsingh, 2007) and skin (Calomme and Vanden Berghe, 1997). Silicon deficiency, in contrast, has been associated to detrimental effects on bone mineralization and growth or skin elasticity and healing (Carlisle,

* Corresponding author. UMR NutriPass, CC 023, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Tel.: +33 467 143 520; fax: +33 04 67 14 35 21.
E-mail address: gaillet@univ-montp2.fr (S. Gaillet).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.021
0278-6915/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1976). The importance of silicon has also been demonstrated in cardiovascular pathophysiology and especially in the prevention of atherosclerosis (Loeper et al., 1979). An inverse relationship between the ingestion of silicon and the development of atherosclerosis has been reported (Loeper et al., 1988), and in spontaneously hypertensive rats, silicon supplementation reduces hypertension and increases antihypertensive and antiatherogenic gene expressions in the aorta (Maehira et al., 2011). Thus, a supplementation may be justified in preventing these effects, especially in the case of suspicion or installation of pathologies.

A fundamental step is to transform silicon in an organic form that is much more assimilated by the body than mineral forms. This is what we have achieved by incorporating it into spirulina.

The cyanobacteria Spirulina platensis is commercially available for human consumption. Spirulina are a good source of vitamins and minerals and are used as nutraceutical food supplements with no toxic side effects (Chamorro et al., 1988). They are particularly suitable for the production of specific bioactive compounds that they are able to accumulate in an organically bio-transformed form. Thus, new kind of food supplements has been developed and could serve as a rich source of trace elements (Mazo et al., 2007). Silicon is one of those trace elements essential in human nutrition.

Incorporating silicon into spirulina is a way to produce a bioavailable food supplement. Thus, given the beneficial effects of silicon and the antioxidant, hypolipidaemic and anti-inflammatory properties of spirulina (Deng and Chow, 2010) a food supplement was prepared. It has been shown that spirulina had no toxic effects *in vivo* and *in vitro* and did not release toxins (Heussner et al., 2012; Yang et al., 2011).

Whereas Buesen et al. (2014) reported that silicon dioxide nanomaterials neither cause local nor systemic effects upon subacute oral administration in rats and Horie et al. (2014) demonstrated that silicon dioxide nanoparticles do not exert potent cytotoxic effects on cells in culture, others have shown that (i) silicon dioxide increased enzymatic activities in the plasma, indicating an endothelial lung damage (Deb et al., 2012), (ii) silica nanoparticles exposure triggered a pro-inflammatory status in human bronchial epithelial BEAS-2B cells (Skuland et al., 2014), (iii) silicon in the form of silicon carbide induced no cytotoxicity but triggered pro-oxidative and pro-inflammatory responses of variable intensity on RAW 264.7 macrophages (Boudard et al., 2014).

Thus, we aimed to investigate here for the first time the safety and potential toxicity of repeated doses administration of silicon-rich spirulina (for 90 days) on rats. The maximum dose administered corresponds to 5 times the daily human recommended dose by the European Food Safety Authority.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Spirulina (produced at PhycoBiotech, Lunel, France) grown in 25 m^3 pools under greenhouse with natural light, and temperature is controlled at 33 °C, in a Zarouk's medium in the presence of sodium metasilicate (Na_2O_3Si). This medium contained $NaHCO_3$, 16.8 g/L; K_2HPO_4, 0.5 g/L; $NaNO_3$, 2.5 g/L; K_2SO_4, 1.0 g/L; NaCl, 1.0 g/L; $MgSO_4.7H_20$, 0.2 g/L; $CaCl_3$, 0.04 g/L; $FeSO_4.7H_20$, 0.01 g/L; EDTA, 0.08 g/L; H_3BO_3, 2.86 mg/L; $MnCl_2.4H_2O$, 220 mg/L; $CuSO_4$. $5H_2O$, 79 mg/L; MoO_3, 15 mg/L; and Na_2MoO_4, 21 mg/L and was supplied with light aeration (30 L/min) and the addition of 0.03% CO_2. The pool is continuously stirred with pumps. At the end of the growth, the biomass was recovered and filtered trough a 40 mm membrane, thoroughly washed with distilled water, frozen and lyophilized. Resultant spirulina contained 1% silicon, as indicated by the manufacturer.

2.2. Animals and experimental design

Thirty male and thirty female Sprague-Dawley rats (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle, France) weighing ~100 g were housed at 23 ± 1 °C and were randomly divided in five groups of six animals for each sex, then subjected to a 12 h light/dark cycle with free access to both food and water. They were handled in compliance with European Union rules and according to the guidelines of the NIH (National Research Council, 1985) and the Committee for Animal Care at the University of Montpellier (France).

They were fed *ad libitum* on a standard diet supplied by SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) consisting of 236 g/kg casein, 3.5 g/kg L-methionine, 300 g/kg corn starch, 30 g/kg maltodextrin 10, 290.5 g/kg sucrose, 50 g/kg cellulose, 45 g/kg vegetable oil (10.3% energy of the diet), 35 g/kg mineral mix and 10 mg/kg vitamin mix. Vitamin and mineral mixes were formulated according to AIN-93 guidelines (Reeves et al., 1993). Rats and uneaten food were weighed every day. For each sex, rats of each group received daily by gavage either tap water (Control, CTR) or an aqueous suspension of crude spirulina (SP) at a dose of 285 mg/kg BW, or silicon-rich spirulina (SES) at a dose of 28.5 mg/kg BW (SES1 group) or SES at a dose of 57 mg/kg BW (SES2 group), or SES at a dose of 285 mg/kg BW (SES3) for 90 days. All animals were observed twice daily for general appearance, behaviour, signs of morbidity and mortality (once before treatment and once after). The SES2 dose (57 mg/kg BW/day) corresponds to the EFSA recommendations adapted to the rat (EFSA, 2004). The SES1 dose (28.5 mg/kg BW/d) is a two-fold lower dose, while the SES3 dose is fivefold times higher than SES2.

2.3. Sampling

At the end of the experimental period, rats were deprived of food overnight and blood samples were collected under anaesthesia by cardiac puncture. The liver was perfused with 0.15 M NaCl to remove residual blood, rapidly excised, weighed, sectioned for analyses, and stored at –80 °C. Heart, spleen and kidneys were rapidly excised, blotted dry and weighed.

2.4. Haematological and biochemical plasma parameters

All samples were collected early in the working day to reduce biological variation.

Test tubes containing EDTA, as an anticoagulant, were used for haematology. Haematological parameters (red blood cells (RBCs), haemoglobin, haematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBCs), neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes, platelets) were determined with an ABX Pentra DX 120 whole blood automated analyser (Horiba ABX, Montpellier, France).

Heparinized tubes were used for blood biochemistry. All parameters (urea, creatinine, cholesterol (CH), triglyceride (TG), chloride (Cl), calcium (Ca), phosphorus (P), bilirubin, aspartate transaminase (ASAT), alanine transaminase (ALAT) and gamma-glutamyl transferase (GGT)) were determined in plasma samples, after centrifugation (2500 rpm, 15 min), with a Cobas® 6000 automated analyser (Roche, Meylan, France).

2.5. Oxidative status

Liver superoxide anion ($O_2^{\circ-}$) production by NADPH oxidase were evaluated by the intensity of lucigenin-enhanced chemiluminescence (10 μM lucigenin), measured with a luminometer (Perkin Elmer Wallac, Victor, Turku, Finland) on tissue homogenates, as previously described (Romain et al., 2012). Results were expressed as relative light units (RLU/mg protein).

The index of lipid peroxidation was determined from the liver homogenate by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS) according to Sunderman et al. (1985). After thiobarbituric acid had been reacted with malondialdehyde, the reaction product was measured spectrometrically at 532 nm. Optical imperfections were corrected according to Allen (1950) at 508 and 556 nm. Results were expressed as nanomoles of TBARS per gram of tissue.

Total thiols (SH) were determined according to Faure and Lafond (1995). The method is based on the reaction of 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic) (DTNB) with the samples producing a yellow product, the thionitrobenzoic acid (TNB), measured spectrometrically at 412 nm. Results were expressed as nanomoles of SH per milligram of protein.

Protein content was determined by using a commercial protein assay (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) according to the method of Smith et al. (1985) and using bovine serum albumin as standard.

Liver tissue was homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and spun at 3500 *g* for 15 min at 4 °C. The superoxide dismutase activity (SOD) was assayed in the supernatant using the method of Marklund and Marklund (1974) and Marklund (1976), based on a competition between the oxidation reaction of pyrogallol by $O_2^{\circ-}$ and the dismutation of $O_2^{\circ-}$ by SOD. The reaction product was measured spectrometrically at 320 nm. Results were expressed as unity activity per milligram of protein. The glutathione peroxidase activity (GPx) was evaluated using the method of Flohé and Günzler (1984), and activity was expressed as milli-units per milligram of protein. The activity of catalase (CAT) was measured according to Beers and Sizer (1952). The enzyme catalyses the decomposition of hydrogen peroxide into water molecule. Activity was expressed as units per milligram of protein.

2.6. Inflammatory factors evaluation

For pro-inflammatory cytokines determination, liver tissue was homogenized in 10 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 2M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% Tween 80, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and centrifuged at 9000 *g* for 30 min at 4 °C. The

resultant supernatant was used for cytokines determination. Liver tumour-necrosis-factor-alpha (TNF day α) and interleukin-6 (IL-6) levels were quantified by ELISA using commercial kits from R&D Systems (Lille, France).

2.7. Statistical analyses

Data are shown as means ± SEM. Statistical analysis of the data was carried out using StatView IV software (Abacus Concept, Berkeley, CA) by one-way ANOVA followed by Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Repeated dose (90 days) toxicological evaluation

All animals survived the 90-day treatment period. No abnormal clinical signs, behavioural changes or macroscopic findings were observed. No significant differences in food (Table 1) and water consumption were noted among groups. As shown in Table 1, there are no significant differences in body weight gain. As far as the major organs' weight, there was no effect of the treatment, except in female heart weight SES2 which was however to the limit of significance ($p = 0.0476$).

3.2. Haematological and biochemical parameters

Some haematological parameters differed between control and some treated groups (Table 2). In female rats, a 10% decrease in red blood cells number appeared just as a significant basophils per cent increase in SES2 group compared to CTR group. There are no differences in male groups. Moreover, all values were within usual limits (Bailly and Duprat, 1990; Fallon, 1996).

As shown in Table 3, biochemical parameters were not affected whatever the group except in female rats, who showed 29% ($p = 0.0028$), 21% ($p = 0.0223$) and 38% ($p = 0.0002$) reduced ALAT activity in SP, SES2 and SES3 groups respectively compared to controls. In male rats, no parameter changed regardless of the dose supplied. Female rats also exhibited reduced triglyceride levels whereas males did not. However, the data were within normal ranges according to Moraillon et al. (2010).

3.3. Liver oxidative status

$O_2^{\circ-}$ is the main free radical and we measured its production in the liver *via* the NADPH oxidase enzyme activity. TBARS level was analysed as a marker of lipid peroxidation, and total thiols level was measured to evaluate the extent of oxidative damage proteins. For these three parameters of the hepatic oxidative stress, there is no difference between the groups, with the exception of the female group SES3 (Table 4). Only TBARS level for SES3 female group was increased by 97.5% compared to CTR group and it is likely due to two animals in the group that responded differently, leading to high average and SEM values. However, the activity of NADPH oxidase, a pro-oxidative enzyme, measured through the $O_2^{\circ-}$ production, just as thiols content were not modified regardless of the SES dose. These findings suggest that SES treatment did not induce any oxidative stress. Moreover, females showed in particular a smaller $O_2^{\circ-}$ production and a lower thiols rate than males, that could be explained by an oestrogenic action since it is known to protect against oxidation (Chakrabarti et al., 2014; Shwaery et al., 1998).

Liver antioxidant enzyme activities SOD, GPx and CAT were not modified by SES treatment (Table 5). As seen above for $O_2^{\circ-}$ production and thiols, higher SOD and GPx activities appeared in females due to oestrogenic hormones (Borrás et al., 2010; Wu et al., 2014).

3.4. Liver inflammatory status

The IL-6 and TNF-α levels were measured as pro-inflammatory markers. As shown in Table 6, both levels were not significantly different among groups. This suggests that SES treatment does not trigger an inflammatory status, which reinforces the values obtained on oxidative stress status. In fact, oxidative stress and inflammation are closely linked. The pathways that generate mediators of inflammation such as interleukins are closely linked to oxidative stress (Reuter et al., 2010).

4. Conclusions

This study represents the first standard toxicological data on silicon-rich spirulina. No haematological nor biochemical anomalies were noted. SES treatment did not reveal any changes in food

Table 1
Body and organ weights in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
Food intake (g/day)	21.3 ± 2.2	19.6 ± 3.6	21.6 ± 2.8	21.0 ± 1.9	21.9 ± 2.3
Body weight gain (g)	216 ± 17	184 ± 8	193 ± 6	186 ± 10	213 ± 12
Organ weight (% BW)					
Liver	3.00 ± 0.14	3.27 ± 0.12	3.03 ± 0.14	3.09 ± 0.08	2.85 ± 0.20
Heart	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.01*	0.35 ± 0.01
Rate	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.15	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Kidneys	0.61 ± 0.01	0.67 ± 0.17	0.67 ± 0.03	0.66 ± 0.01	0.67 ± 0.03
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
Food intake (g/day)	30.8 ± 3.9	29.7 ± 3.2	30.8 ± 3.0	29.9 ± 4.0	30.3 ± 3.7
Body weight gain (g)	469 ± 19	476 ± 37	513 ± 23	476 ± 24	458 ± 18
Organ weight (% BW)					
Liver	2.50 ± 0.13	2.72 ± 0.13	2.65 ± 0.06	2.50 ± 0.13	2.55 ± 0.12
Heart	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Rate	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01
Kidneys	0.52 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.54 ± 0.01	0.55 ± 0.02

[a] Data are expressed as mean + SEM.
* $P < 0.05$ compared to untreated rats (CTR group).

Table 2
Haematological parameters in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
RBC ($\times 10^4$/mm^3)	720 ± 17	707 ± 16	729 ± 26	647 ± 38*	703 ± 28
Haemoglobin (g/dL)	14.40 ± 0.40	14.18 ± 0.48	13.38 ± 0.48	13.40 ± 0.20	14.27 ± 0.59
Haematocrit (%)	38.90 ± 0.93	39.70 ± 1.25	39.80 ± 1.53	37.30 ± 0.40	39.40 ± 1.25
MCV (fl)	53.80 ± 0.80	54.30 ± 0.76	54.50 ± 0.56	54.30 ± 0.33	54.20 ± 0.75
MCH (pg)	20.0 ± 0.40	20.10 ± 0.29	19.00 ± 0.50	19.60 ± 0.31	20.30 ± 0.30
MCHC (g/dL)	36.90 ± 0.28	35.80 ± 0.63	35.90 ± 0.97	35.90 ± 0.58	36.20 ± 0.40
WBC ($\times 10^2$/mm^3)	27.0 ± 4.0	24.0 ± 1.4	28.0 ± 2.7	25.0 ± 4.8	28.0 ± 3.4
Neutrophils (%)	12.00 ± 1.74	13.50 ± 1.15	13.20 ± 1.03	12.40 ± 0.72	13.00 ± 0.80
Eosinophils (%)	0.60 ± 0.18	0.60 ± 0.25	0.50 ± 0.16	0.90 ± 0.16	0.70 ± 0.24
Basophils (%)	0.17 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.06*	0.23 ± 0.04
Lymphocytes (%)	86.3 ± 1.9	84.4 ± 1.1	85.0 ± 1.2	85.8 ± 0.7	85.0 ± 0.9
Monocytes (%)	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.0*	1.0 ± 0.1
Platelets ($\times 10^3$/mm^3)	697 ± 82	698 ± 76	710 ± 63	638 ± 112	597 ± 43
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
RBC ($\times 10^4$/mm^3)	821 ± 40	791 ± 47	757 ± 77	823 ± 20	732 ± 38
Haemoglobin (g/dL)	14.82 ± 0.63	14.95 ± 0.99	13.70 ± 1.29	14.98 ± 0.21	13.86 ± 0.72
Haematocrit (%)	41.60 ± 1.81	42.80 ± 2.35	40.80 ± 3.86	42.20 ± 0.66	39.50 ± 1.86
MCV (fl)	50.80 ± 0.86	51.30 ± 0.33	51.80 ± 0.60	51.50 ± 0.86	52.20 ± 0.54
MCH (pg)	18.10 ± 0.37	18.90 ± 0.59	18.30 ± 0.21	18.30 ± 0.28	18.60 ± 0.20
MCHC (g/dL)	35.70 ± 0.37	36.70 ± 1.01	35.30 ± 0.29	35.50 ± 0.13	35.60 ± 0.21
WBC ($\times 10^2$/mm^3)	68.0 ± 8.7	66.0 ± 1.1	54.0 ± 7.4	58.0 ± 6.6	60.0 ± 1.1
Neutrophils (%)	10.20 ± 1.55	11.00 ± 1.37	10.20 ± 0.61	11.20 ± 1.91	7.90 ± 0.46
Eosinophils (%)	0.40 ± 0.18	0.60 ± 0.16	0.40 ± 0.14	0.30 ± 0.03	0.40 ± 0.08
Basophils (%)	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.20 ± 0.09	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.03
Lymphocytes (%)	87.2 ± 1.7	86.4 ± 1.6	87.5 ± 1.0	86.6 ± 1.9	98.5 ± 0.5
Monocytes (%)	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.6
Platelets ($\times 10^3$/mm^3)	646 ± 71	602 ± 74	528 ± 74	590 ± 782	561 ± 97

[a] Data are expressed as mean + SEM.
* $P < 0.05$ compared to untreated rats (CTR group).

Table 3
Blood biochemical parameters in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
Urea (mmol/L)	5.04 ± 0.43	4.79 ± 0.46	5.93 ± 0.36	5.51 ± 0.47	4.72 ± 0.31
Creatinine (μmol/L)	32.28 ± 2.16	32.77 ± 3.11	34.82 ± 1.31	36.00 ± 4.20	30.68 ± 1.38
CH (mmol/L)	2.74 ± 0.32	2.51 ± 0.40	2.38 ± 0.27	1.97 ± 0.08	2.01 ± 0.12
TG (mmol/L)	2.21 ± 0.53	0.80 ± 0.13*	0.90 ± 0.17*	0.64 ± 0.06*	1.14 ± 0.11
Cl (mmol/L)	97.30 ± 0.84	98.20 ± 0.70	98.50 ± 0.85	98.30 ± 0.33	98.00 ± 0.45
Ca (mmol/L)	2.72 ± 0.04	2.70 ± 0.05	2.66 ± 0.06	2.65 ± 0.02	2.70 ± 0.03
P (mmol/L)	1.71 ± 0.10	1.87 ± 0.15	1.49 ± 0.08*	1.85 ± 0.07	2.00 ± 0.15
Bilirubin (μmol/L)	2.50 ± 0.22	2.33 ± 0.21	2.00 ± 0.00	2.33 ± 0.21	2.33 ± 0.21
ASAT (U/L)[b]	85.60 ± 4.21	86.20 ± 6.17	82.40 ± 7.84	86.40 ± 3.98	75.83 ± 3.14
ALAT (U/L)[b]	37.2±2.35	26.20 ± 2.92*	31.00 ± 2.70	29.50 ± 1.65*	23.00 ± 1.63*
GGT (UI/L)[b]	3.33 ± 0.66	3.80 ± 0.37	4.00 ± 0.68	3.33 ± 0.42	4.50 ± 0.50
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
Urea (mmol/L)	5.73 ± 0.15	6.04 ± 0.31	6.57 ± 0.44	6.54 ± 0.22	6.51 ± 0.32
Creatinine (μmol/L)	38.80 ± 1.03	40.28 ± 0.99	39.08 ± 1.73	39.23 ± 1.57	37.63 ± 2.78
CH (mmol/L)	1.71 ± 0.09	1.57 ± 0.03	1.71 ± 0.08	1.51 ± 0.09	1.50 ± 0.06
TG (mmol/L)	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.15	1.31 ± 0.17	1.14 ± 0.07	0.98 ± 0.14
Cl (mmol/L)	98.50 ± 1.15	97.50 ± 0.56	97.20 ± 0.31	98.00 ± 0.63	98.00 ± 0.84
Ca (mmol/L)	2.68 ± 0.06	2.62 ± 0.02	2.68 ± 0.02	2.68 ± 0.02	2.65 ± 0.05
P (mmol/L)	2.28 ± 0.08	2.25 ± 0.05	2.41 ± 0.72	2.27 ± 0.06	2.46 ± 0.05
Bilirubin (μmol/L)	2.17 ± 0.17	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.17 ± 0.17	2.00 ± 0.00
ASAT (U/L)[b]	106.60 ± 9.13	97.00 ± 2.70	90.60 ± 6.30	93.80 ± 5.72	96.33 ± 4.46
ALAT (U/L)[b]	46.80 ± 1.99	43.80 ± 2.76	44.80 ± 3.20	41.80 ± 3.66	44.60 ± 3.96
GGT (UI/L)[b]	0.83 ± 0.17	1.00 ± 0.00	1.33 ± 0.33	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.17

[a] Data are expressed as mean + SEM. * $P < 0.05$ compared to untreated rats (CTR group).[b] ASAT: aspartate transaminase; ALAT: alanine transaminase; GGT: gamma-glutamyl transferase.

Table 4
Oxidative stress markers in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
$O_2^{\bullet-}$ (RLU/mg prot)	1526 ± 229	1581 ± 222	1292 ± 134	1407 ± 234	1241 ± 178
TBARS (nmol/g)	292.2 ± 65.0	323.3 ± 88.4	389.9 ± 79.9	370.6 ± 88.6	577.3 ± 162.7*
SH (nmol/mg prot)	98.0 ± 23.9	77.1 ± 24.7	81.3 ± 29.5	79.4 ± 17.0	75.0 ± 18.1
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
$O_2^{\bullet-}$ (RLU/mg prot)	2432 ± 278	2593 ± 311	2312 ± 360	2115 ± 274	1947 ± 249
TBARS (nmol/g)	193.8 ± 64.4	191.3 ± 32.1	208.7 ± 36.6	227.9 ± 45.0	219.9 ± 45.3
SH (nmol/mg prot)	87.4 ± 27.3	107.7 ± 13.4	102.2 ± 13.4	105.8 ± 10.1	101.2 ± 10.4

[a] Data are expressed as mean + SEM.
* $P < 0.05$ compared to untreated rats (CTR group).

Table 5
Liver antioxidant enzyme activities in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
SOD (U/mg prot)	20.3 ± 1.8	20.9 ± 2.9	20.9 ± 3.3	20.7 ± 3.7	21.6 ± 2.5
GPx (mU/mg prot)	6865 ± 202	6674 ± 571	7091 ± 892	6694.4 ± 384	7421 ± 636
CAT (U/mg prot)	702 ± 89	691 ± 112	676 ± 175	628 ± 82	667 ± 98
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
SOD (U/mg prot)	17.5 ± 1.8	17.7 ± 3.1	18.2 ± 2.1	18.3 ± 2.6	17.2 ± 1.6
GPx (mU/mg prot)	3338 ± 562	4203 ± 886	3674 ± 496	3884 ± 420	3556 ± 533
CAT (U/mg prot)	728 ± 96	772 ± 134	711 ± 42	787 ± 108	749 ± 119

[a] Data are expressed as mean + SEM.

Table 6
Liver pro-inflammatory cytokine levels in control rats (CTR) and after a 90-day treatment with crude spirulina (SP) at 285 mg/kg/BW/day, or silicon-rich spirulina at 28.5 (SES1), 57 (SES2) and 285 mg/kg BW/day (SES3).[a]

	Female				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
IL-6 (pg/mg prot)	726.8 ± 149.9	719.2 ± 217.8	611.9 ± 209.5	849.7 ± 274.5	649.41 ± 125.1
TNF-α (pg/mg prot)	417.6 ± 99.1	299.0 ± 99.0	457.8 ± 142.3	471.6 ± 73.5	418.1 ± 141.6
	Male				
	CTR	SP	SES1	SES2	SES3
IL-6 (pg/mg prot)	1083.5 ± 476.1	1098.7 ± 411.3	1061.7 ± 449.8	873.4 ± 120.0	1063.7 ± 280.2
TNF-α (pg/mg prot)	764.9 ± 244.1	634.0 ± 195.3	883.7 ± 373.1	837.8 ± 171.5	742.7 ± 260.0

[a] Data are expressed as mean + SEM.

and water (not shown) consumption and behaviours. Based on these findings, SES was well tolerated at daily doses of 28.5, 57 and 285 mg/kg BW/day for 90 days in the rats and there is no evidence for systemic and liver adverse effects and toxicity. Furthermore, there were no signs of oxidative stress or inflammation in the liver, even with the maximum dose of SES used, demonstrating the safety of this dietary supplement.

These findings suggest that silicon-rich spirulina does not induce adverse physiological or biochemical nor pathological changes and could have potential applications in several situations in which oxidative stress and/or inflammation are increased, such as cardiovascular diseases for example. This is in accordance with Yang et al. (2011) and Heussner et al. (2012) relative to spirulina, and corroborates the findings of Buesen et al. (2014) and Horie et al. (2014) although silicon was in the form of silicon dioxide nanoparticles in these two last studies. Elsewhere, further investigations are needed to understand by which mechanisms SES could protect the antioxidant system.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Aknowledgements

The authors are grateful to Phyco-Biotech company for its interest in this work and its generous gift of the spirulina. Joris Vidé

was supported by a "CIFRE grant" (Convention Industrielle de Formation par la Recherche, no. 0084/2012) from Phyco-Biotech (Montpellier, France) and the French "Association Nationale de la Recherche et de la Technologie".

References

Allen, W.M., 1950. A simple method for analyzing complicated absorption curves used in the colorimetric determination of urinary steroids. J. Clin. Endocrinol. 10, 71–83.

Anonymous, 2004. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of silicon. EFSA J. 60, 1–11.

Bailly, Y., Duprat, P., 1990. Normal blood cell values. Rat. Hemopoietic Syst. 27–38. doi:10.1007/978-3-642-84110-1; Monographs on Pathology of Laboratory Animals.

Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195, 133–140.

Bond, R., McAuliffe, J.C., 2003. Silicon biotechnology: new opportunities for carbohydrate science. Aust. J. Chem. 56, 7–11.

Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., Viña, J., 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1802, 205–211.

Boudard, D., Forest, V., Pourchez, J., Boumandi, N., Tomatis, M., Fubini, B., et al., 2014. In vitro cellular responses to silicon carbide particles manufactured through the Acheson process: impact of physico-chemical features on pro-inflammatory and pro-oxidative effects. Toxicol. In Vitro 28, 856–865.

Buesen, R., Landsiedel, R., Sauer, U.G., Wohlleben, W., Groeters, S., Strauss, V., et al., 2014. Effects of SiO_2, ZrO_2, and $BaSO_4$ nanomaterials with or without surface functionalization upon 28-day oral exposure to rats. Arch. Toxicol. 88, 1881–1906.

Calomme, M.R., Vanden Berghe, D.A., 1997. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. Biol. Trace Elem. Res. 56, 153–165.

Carlisle, E.M., 1976. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. J. Nutr. 106, 478–484.

Chakrabarti, M., Haque, A., Banik, N.L., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Ray, S.K., 2014. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration. Brain Res. Bull. 109, 22–31.

Chamorro, G.A., Herrera, G., Salazar, M., Salazar, S., Ulloa, V., 1988. Subchronic toxicity study in rats fed Spirulina. J. Pharm. Belg. 43, 29–36.

Deb, U., Lomash, V., Raghuvanshi, S., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., 2012. Effects of 28 days silicon dioxide aerosol exposure on respiratory parameters, blood biochemical variables and lung histopathology in rats. Environ. Toxicol. Pharmacol. 34, 977–984.

Deng, R., Chow, T.J., 2010. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. Cardiovasc. Ther. 28, e33–e45.

EFSA, 2004. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of silicon. EFSA J. 60, 1–11.

Exley, C., 1998. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. J. Biol. Inorg. Chem. 69, 139–144.

Fallon, M.T., 1996. Rats and mice. In: Laber-Laird, K., Swindle, M.M., Flecknell, P. (Eds.), Handbook of Rodent and Rabbit Medicine. Pergamon/Elsevier Science Ltd., Oxford, pp. 1–38.

Faure, P., Lafond, J.L., 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A.E., Cadet, J., Kalnyanaraman, B., Fontecave, M., Pierre, J.L. (Eds.), Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Birkauser Press, Basel, Boston, Berlin, pp. 237–248.

Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114–121.

Heussner, A.H., Mazija, L., Fastner, J., Dietrich, D.R., 2012. Toxin content and cytotoxicity of algal dietary supplements. Toxicol. Appl. Pharmacol. 265, 263–271.

Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Endoh, S., Fujita, K., Nakamura, A., et al., 2014. Evaluation of cellular effects of silicon dioxide nanoparticles. Toxicol. Mech. Methods 24, 196–203.

Ingri, N., 1978. Aqueous silicic acid, silicates and silicate complexes. In: Bendz, G., Lindquist, I. (Eds.), Biochemistry of Silicon and Related Problems. Plenum Press, New York, pp. 3–50.

Jugdaohsingh, R., 2007. Silicon and bone health. J. Nutr. Health Aging 11, 99–110.

Jugdaohsingh, R., Anderson, S.H., Tucker, K.L., Elliott, H., Kiel, D.P., Thompson, R.P., et al., 2002. Dietary silicon intake and absorption. Am. J. Clin. Nutr. 75, 887–893.

Knight, C.T.G., Kinrade, S.D., 2001. A primer on the aqueous chemistry of silicon. In: Datnoff, G.H., Snyder, G.H., Korndöfer, G.H. (Eds.), Silicon in Agriculture. Elsevier, Amsterdam, pp. 57–84. 8.

Loeper, J., Goy-Loeper, J., Rozensztajn, L., Fragny, M., 1979. The antiatheromatous action of silicon. Atherosclerosis 33, 397–408.

Loeper, J., Goy, J., Fragny, M., Troniou, R., Bedu, O., 1988. Study of fatty acids in atheroma induced in rabbits by an atherogenic diet with or without silicon I.V. treatment. Life Sci. 42, 2105–2112.

Maehira, F., Motomura, K., Ishimine, N., Miyagi, I., Eguchi, Y., Teruya, S., 2011. Soluble silica and coral sand suppress high blood pressure and improve the related aortic gene expressions in spontaneously hypertensive rats. Nutr. Res. 31, 147–156.

Marklund, S., 1976. Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 251, 7504–7507.

Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47, 469–474.

Mazo, V.K., Gmoshinski, I.V., Zorin, S.N., 2007. New food sources of essential trace elements produced by biotechnology facilities. Biotechnol. J. 2, 1297–1305.

Moraillon, R., Legeay, Y., Boussarie, D., Sénécat, O., 2010. Dictionnaire pratique de thérapeutique chien, chat et NAC. MASSON.

National Research Council, 1985. Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals. Publication no. 85-23(rev.). National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., Jr., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. J. Nutr. 123, 1939–1951.

Refitt, D.M., Jugdaohsingh, R., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., 1999. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. J. Inorg. Biochem. 76, 141–147.

Refitt, D.M., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H.F.J., Evans, B.A.J., Thompson, R.P.H., et al., 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. Bone 32, 127–135.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic. Biol. Med. 49, 1603–1616.

Romain, C., Gaillet, S., Carillon, J., Vidé, J., Ramos, J., Izard, J.C., et al., 2012. Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. J. Agric. Food Chem. 60, 11029–11036.

Seaborn, C.D., Nielsen, F.H., 1993. Silicon: a nutritional beneficence for bones, brains and blood vessels? Nutr. Today 28, 13–18.

Shwaery, G.T., Vita, J.A., Keaney, J.F., 1998. Antioxidant protection of LDL by physiologic concentrations of estrogens is specific for 17-beta-estradiol. Atherosclerosis 138, 255–262.

Skuland, T., Ovrevik, J., Lag, M., Schwarze, P., Refsnes, M., 2014. Silica nanoparticles induce cytokine responses in lung epithelial cells through activation of a p38/TACE/TGF-alpha/EGFR-pathway and NF-kappa B signalling. Toxicol. Appl. Pharmacol. 279, 76–86.

Smith, S.K., Krohn, R.I., Mallia, A.K., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., et al., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76–85.

Sunderman, F.W., Jr., Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Reid, M.C., 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. Ann. Clin. Lab. Sci. 15, 229–236.

Wu, J., Williams, D., Walter, G.A., Thompson, W.E., Sidell, N., 2014. Estrogen increases Nrf2 activity through activation of the PI3K pathway in MCF-7 breast cancer cells. Exp. Cell Res. 328, 351–360.

Yang, Y., Park, Y., Cassada, D.A., Snow, D.D., Rogers, D.G., Lee, J., 2011. In vitro and in vivo safety assessment of edible blue-green algae, Nostoc commune var. sphaeroides Kützing and Spirulina plantensis. Food Chem. Toxicol. 49, 1560–1564.

A.3 Conclusion de l'étude 1

Tous les animaux ont survécu pendant les 90 jours de traitement. Aucun comportement singulier ni signe physique anormal n'a été observé chez les rats. Tous les paramètres hématologiques et biochimiques qui ont été quantifiés sont dans les normes. Enfin, ni stress oxydant, ni inflammation n'ont pu être mis en évidence dans le foie des animaux après l'administration de la spiruline enrichie en silicium.

La dose maximum administrée correspond à cinq fois la dose recommandée quotidiennement de silicium chez l'homme.

Nous pouvons donc supposer que l'administration orale de spiruline enrichie en silicium est sans effet néfaste pour l'homme également.

B Etude mise au point du modèle animal d'athérosclérose

B.1 But de l'étude mise au point

Préalablement à notre étude principale (**Etude 2**), une étude préliminaire a été réalisée. Celle-ci vise à comparer et tester divers régimes high fat, dont les sources lipidiques varient. En effet, nous avons voulu nous assurer que le régime administré induit (i) des désordres lipidiques et oxydatifs, (ii) l'apparition de dépôts lipidiques intimaux, critère principal de retenue dans la validation du modèle, et (iii) la présence également d'une stéatose hépatique, facteur de risque indépendant des MCV.

Le premier régime (HF1) testé est celui utilisé au cours d'études précédentes menées au sein de notre équipe. Effectivement, celui-ci, pourtant déclencheur d'athérosclérose précoce dans les travaux réalisés antérieurement (Auger et al., 2005; Sutra et al., 2007; Décordé et al., 2010), semble être désormais moins inducteur (Suh et al., 2011). D'où la nécessité de réaliser cette étude de mise au point du modèle d'athérosclérose. Ce régime HF1 (4350 Kcal / kg) est caractérisé par un apport énergétique lipidique de 31 % provenant du saindoux (150 g/kg) et de cholestérol (5 g/kg) **(Tableau 16)**. De plus, il est carencé en vitamines antioxydantes (vitamines C et E). Le second régime athéromateux (HF2) testé se distingue par une source lipidique provenant d'huile de noix de coco hydrogénée. Un troisième groupe d'animaux standard (STD) est également mis en place et sert de contrôle négatif. La composition du régime HF2, nommé régime athéromateux, et standard est détaillée dans le chapitre Matériels & Méthodes. Les différents régimes sont administrés pendant 12 semaines puis les animaux sont sacrifiés et les différents paramètres évalués.

Tableau 16 : *Composition du régime HF1*

Ingrédients (g / kg)	Régime HF1
Caséine	200
L-Méthionine	3
Amidon de maïs	393
Saccharose	154
Cellulose	50
Saindoux	150
Cholestérol	5
Mélange minéral [1]	35
Mélange vitaminique [2]	10
Energie (Kcal / kg)	**4350**
Energie lipidique (%)	**31**

[1]Le mélange minéral contient (mg/kg régime) : $CaHPO_4$, 17200 ; KCl, 4000 ; NaCl, 4000 ; MgO, 420 ; $MgSO_4$, 2000 ; Fe_2O_3, 120 ; $FeSO_4.7H_2O$, 200 ; éléments trace, 400 ($MnSO_4.H_2O$, 98 ; $CuSO_4.5H_2O$, 20 ; $ZnSO_4.7H_2O$, 80 ; $CoSO_4.7H_2O$, 0,16 ; KI, 0,32) ; amidon, qsp 35 g.

[2]Le mélange vitaminique contient (mg/kg régime) : rétinol, 12 ; cholécalciférol, 0,125 ; thiamine, 40 ; riboflavine, 30 ; acide pantothénique, 140 ; pyridoxine, 20 ; inositol, 300 ; cyanocobalamine, 0,1 ; ménadione, 80 ; acide nicotinique, 200 ; choline, 2720 ; acide folique, 10 ; acide *p*-aminobenzoïque, 100 ; biotine, 0,6 ; amidon qsp 10 g.

B.1.1 Paramètres lipidiques

Tableau 17 : *Paramètres lipidiques plasmatiques*

Groupe	Cholestérol total (mmol/L)	Cholestérol LDL (mmol/L)	Cholestérol HDL (mmol/L)	Triglycérides (mmol/L)	Index athérogénique
Standard	4,01 ± 0,275 [a]	1,88 ± 0,266 [a]	2,13 ± 0,094 [a]	0,43 ± 0,05 [a]	1,89 ± 0,129 [a]
HF1	8,42 ± 0,326 [b]	4,78 ± 0,256 [b]	3,64 ± 0,147 [b]	0,49 ± 0,05 [a]	2,32 ± 0,072 [b]
HF2	11,50 ± 0,329 [c]	7,88 ± 0,357 [c]	3,62 ± 0,181 [b]	1,66 ± 0,17 [b]	3,21 ± 0,167 [c]

Le groupe HF2 présente une cholestérolémie totale d'environ 25 % plus haute que le groupe HF1. Cette différence de cholestérolémie plasmatique est expliquée par une cholestérolémie-LDL 40 % plus élevée, avec une cholestérolémie-HDL équivalente entre les deux groupes. Le cholestérol-LDL étant mis en cause dans la pathologie athéromateuse, le régime HF2 semble plus déclencheur. De plus, les animaux de ce groupe présentent un fort index athérogénique

(CT / C-LDL), ainsi qu'une hypertriglycéridémie en comparaison au groupe standard, cette dernière n'étant pas retrouvée chez le groupe HF1.

La dyslipidémie est donc plus marquée chez les hamsters recevant le régime HF2.

B.1.2 Paramètres oxydatifs : activité de la NADPH oxydase hépatique

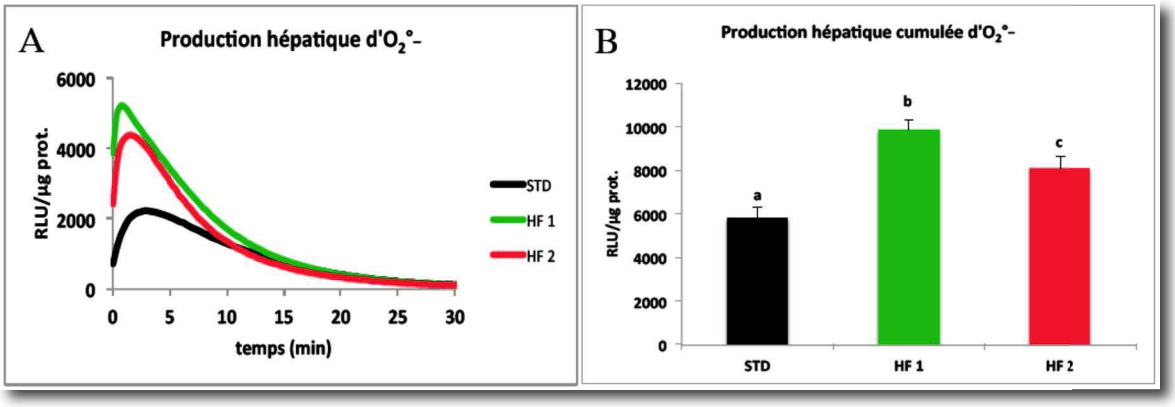


Figure 29 : *Production d'anion superoxyde hépatique*

(A : production pendant 30 minutes. B : production cumulée).

Les barres d'histogramme affectées d'une lettre différentes sont significativement différentes pour p<0,5.

Par rapport au groupe STD, les deux régimes HF induisent bien un stress oxydant hépatique, caractérisé par une production d'anion superoxyde en moyenne 35 % plus élevée. Le groupe HF2 présente néanmoins une activité de la NADPH oxydase significativement plus faible que le groupe HF1.

B.1.3 Histologie : stéatose hépatique

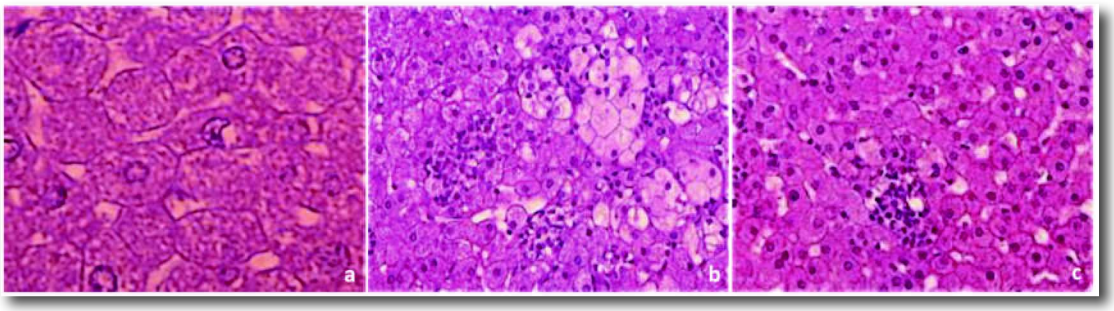


Figure 30 : *Coupes histologiques de foie*

(a : Groupe STD. x100, b : Groupe HF1. x40, c : Groupe HF2. x40)

Les groupes d'animaux nourris avec les régimes HF1 et HF2 présentent une stéatose hépatique micro-vacuolaire d'intensité modérée à sévère. On note également la présence de foyers inflammatoires diffus, absents chez le groupe standard. L'inflammation hépatique sera à confirmer par des mesures plus spécifiques comme la concentration en cytokines pro-inflammatoires. Le paramètre histologique hépatique n'est pas déterminant dans le choix du régime puisque la stéatose constatée est de même intensité pour les deux groupes HF.

B.1.4 Quantification des dépôts lipidiques aortiques :

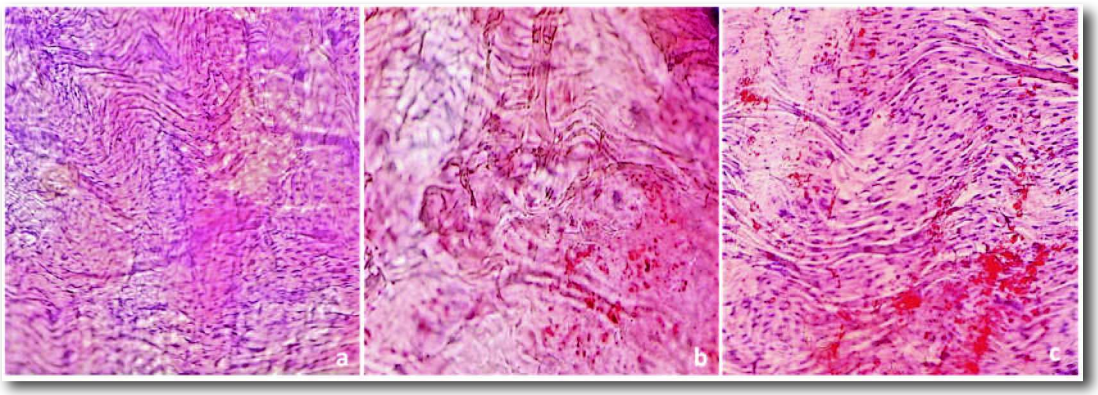


Figure 31 : *Micrographies de sections de la surface de la crosse aortique colorée à l'huile O (a : STD. x100, b : HF1. x100, c : HF2. x100)*

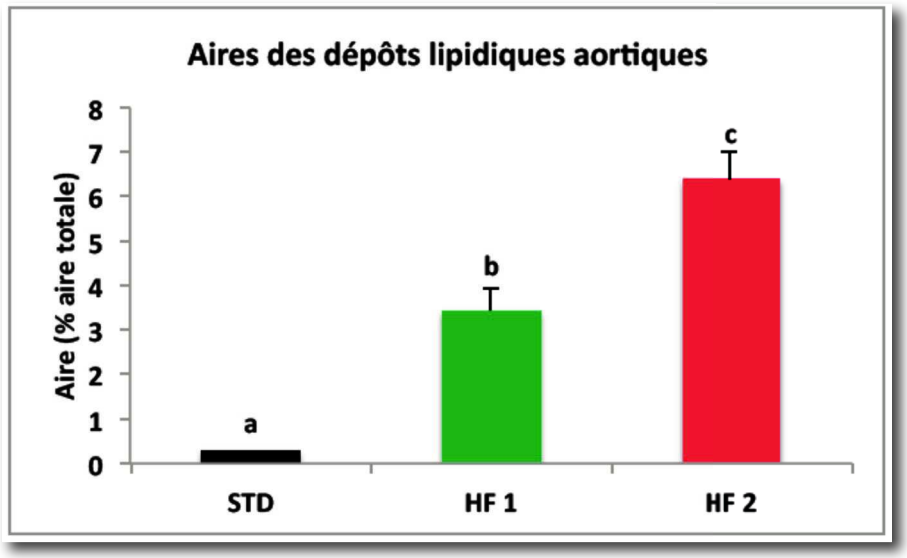


Figure 32 : *Aire des dépôts lipidiques aortiques.*
Les barres d'histogramme affectées d'une lettre différentes sont significativement différentes pour p<0,5.

Les deux groupes HF présentent des dépôts lipidiques aortiques significativement plus importants que le groupe STD. Cependant, l'intensité de l'aire occupée par ces dépôts diffère entre HF1 et HF2, puisque ce dernier groupe présente deux fois plus de dépôts lipidiques.
Le régime HF2 est donc plus intéressant en terme de dépôts lipidiques.

B.2 Conclusion de l'étude mise au point

D'un point de vue des lipides sanguins, le régime HF2 est plus athérogène que le régime HF1. Bien que le paramètre oxydatif hépatique, évalué *via* l'activité de la NADPH oxydase hépatique, soit plus prononcé pour le régime HF1, la composante primordiale de la pathologie, c'est-à-dire la présence de dépôts lipidiques dans la crosse aortique, est largement plus importante chez le groupe HF2.
La différence entre les deux régimes provient de la source lipidique ajoutée pour déclencher la pathologie. Le régime HF1, bien que quantitativement plus riche en graisses, induit une cholestérolémie plasmatique plus faible que le régime HF2 et des dépôts lipidiques moins importants. La qualité de l'apport lipidique est donc un paramètre important à prendre en compte dans le choix d'un régime athéromateux.
Les deux régimes, le saindoux (HF1) et l'huile de coco (HF2), ne fournissent pas les mêmes apports lipidiques. Le saindoux comporte 44 % d'acides gras saturés (AGS) (notamment de l'acide palmitique et stéarique), 37,8 % d'acides gras monoinsaturés (AGMI) et 9 % d'acides gras polyinsaturés (AGPI). L'huile de noix de coco comporte 86,5 % d'AGS (principalement d'acides laurique et myristique), 5,8 % d'AGMI et 1,8 % d'AGPI.
Globalement, les AGS ont un effet hypercholestérolémiant (Siri-Tarino et al., 2010). Les études sur des modèles animaux ont démontré que les AGS augmentent le cholestérol-LDL en inhibant l'activité des récepteurs aux LDL et en augmentant la production de lipoprotéines à ApoB (Dietschy, 1998).
Mais ces effets diffèrent selon l'acide gras considéré. L'acide stéarique est l'AGS ayant le moins d'effet sur la concentration en cholestérol-LDL, tandis que les AGS à chaîne plus courte (acide laurique, myristique et palmitique) augmentent d'avantage le cholestérol lié aux LDL (Mensink et al., 2003).
Ces effets délétères des AGS peuvent expliquer la présence d'une athérosclérose précoce sur notre modèle, caractérisée par un stress oxydant et des dépôts lipidiques aortiques. De plus, la différence de composition en AGS entre le saindoux et l'huile de coco hydrogénée peut

expliquer une partie des effets retrouvés chez le groupe HF2. Celle-ci démontre un processus athéromateux plus intense que chez le groupe HF1 où la ration lipidique provient essentiellement du saindoux.

Nous avons donc sélectionné le régime HF2 (régime athéromateux) pour l'induction nutritionnelle de l'athérosclérose précoce chez notre modèle animal. L'efficacité de ce régime a été démontrée dans une étude publiée dans ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** (**2012**). Ce régime sera donc utilisé pour l'étude principale de nos travaux (**Etude 2**).

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Article

pubs.acs.org/JAFC

Vineatrol and Cardiovascular Disease: Beneficial Effects of a Vine-Shoot Phenolic Extract in a Hamster Atherosclerosis Model

Cindy Romain,[†] Sylvie Gaillet,[†] Julie Carillon,[†] Joris Vidé,[†] Jeanne Ramos,[‡] Jean-Claude Izard,[§] Jean-Paul Cristol,[†] and Jean-Max Rouanet*[,†]

[†]Nutrition & Métabolisme, UMR 204 NUTRIPASS, Prévention des Malnutritions & des Pathologies Associées, Université Montpellier Sud de France, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

[‡]Service d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalo-Universitaire Guy de Chauliac, Avenue Augustin Fliche, 34095 Montpellier, France

[§]Actichem S.A., 121 avenue du Danemark, 82000 Montauban, France

ABSTRACT: We evaluated the effect of the intake of a grapevine-shoot phenolic extract (Vineatrol 30) on early atherosclerosis in hamsters fed a hyperlipidic diet. Golden Syrian hamsters received for 13 weeks either a standard diet, a high-fat (HF) diet, or the HF diet plus Vineatrol 30 at 0.04, 0.2, or 1.0 mg/(kg body weight/d). We measured plasma lipids and glucose, insulin, leptin and adiponectin, as well as liver TNF-α and IL-6 levels. Oxidative stress was assessed by measuring plasma paraoxonase activity (PON) and liver superoxide anion production ($O_2^{\bullet-}$). The aortic fatty streak area (AFSA) was also determined. In comparison with HF group, we demonstrated that the highest dose of Vineatrol 30 was capable of decreasing AFSA (67%), insulinemia (40%), and leptinemia (8.7%), which were increased by the HF diet. We also showed increased $O_2^{\bullet-}$ production (35%) and a rise in levels of the liver proinflammatory cytokines TNF-α (22%) and IL-6 (21%), accompanied by a fall in PON activity (56%) due to the HF diet versus the standard diet. In contrast, except plasma adiponectin levels that are not changed, Vineatrol 30 treatment lowered AFSA (67%), $O_2^{\bullet-}$ production (36%), insulin resistance (42%), leptinemia (9%), liver TNF-α (18%) and IL-6 (15%), while it rose PON activity (29%). These findings demonstrate the preventive effects of polyphenols present in Vineatrol 30 in managing cardiovascular, metabolic, and inflammatory risk factors.

KEYWORDS: *hamster, atherosclerosis, oxidative stress, liver inflammation, Vineatrol 30*

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVDs) are leading causes of morbidity and mortality in industrialized countries. There is ample evidence that atherosclerosis results from a combination of hypercholesterolemia, oxidative stress, and low-grade inflammation.[1,2] Some studies have suggested that nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) contributes to chronic inflammation through the systemic release of pro-inflammatory mediators from the liver.[3,4] In addition, since several studies suggest that polymorphic variations in endogenous antioxidants are linked to increased risk for atherosclerosis,[5] the reactive-oxygen-species-induced depletion of antioxidants is a key factor in the initiation of atherosclerosis. The mechanisms linking non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis may thus be represented by increased oxidative stress and chronic subclinical inflammation.[6] Serum paraoxonase (PON) is a 43- to 45-kDa glycoprotein synthesized mainly by the liver that circulates in serum in association with high-density lipoprotein (HDL).[7] PON is a calcium-dependent esterase that hydrolyzes a broad spectrum of substrates including organophosphates, arylesters and lactones.[8] PON was also shown to be able to hydrolyze specific oxidized lipids [9] and thus to reduce oxidative stress in atherosclerotic lesions.[10] PON also protects HDL particles from oxidation and increases its ability to induce macrophage cholesterol efflux.[7]

Many lines of evidence support the beneficial health effects of polyphenolic compounds, which are powerful antioxidants, in the prevention of CVDs. In animal models and humans, evidence supports the hypothesis that the consumption of food and beverages rich in polyphenols is associated with a lower incidence of CVDs.[11−14] We have also previously shown that an enzymatic antioxidant from melons prevents early atherosclerosis and liver steatosis in hypercholesterolemic hamsters.[15] Other studies in hypercholesterolemic rabbits have attributed cardioprotective effects to resveratrol, a natural polyphenol abundant in grapes and red wines.[10] More recently, Zghonda et al.[16] have reported that ε-viniferin, a dimer of resveratrol, is more effective than resveratrol in inhibiting vascular smooth cell proliferation and migration. In addition, it has been shown that resveratrol is a potent anti-inflammatory agent, inhibiting TNF-α-induced NF-κB activation and inflammatory gene expression, and attenuating monocyte adhesion in human coronary artery endothelial cells.[17]

Given the potential benefits of resveratrol and its oligomers in the modulation of oxidative stress and the inflammatory environment, we aimed to investigate for the first time the effects of Vineatrol 30, a grapevine-shoot extract that contains resveratrol and its oligomers, on the cardiovascular and hepatic system in a diet-induced atherosclerosis model in hamsters, in

Received: April 17, 2012
Revised: October 18, 2012
Accepted: October 19, 2012
Published: October 19, 2012

ACS Publications © 2012 American Chemical Society

Table 1. Body Weight, Food Intake, And Plasma Cholesterol, Triglycerides, Glucose and Insulin in Hamsters Fed a Standard Diet (S), a High-Fat Diet (C), or a HF Diet Plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2), or 1.0 mg/(kg BW/day) (VT3) for 13 Weeks[a]

	S	C	VT1	VT2	VT3
Body wt gain (g)	32.0 ± 2.2[a]	60.6 ± 5.6[b]	56.2 ± 3.6[b]	64.7 ± 5.6[b]	59.2 ± 5.1[b]
Food intake (g/day)	4.75 ± 0.46[a]	7.82 ± 0.74[b]	7.08 ± 0.85[b]	7.69 ± 1.10[b]	7.89 ± 1.12[b]
Plasma					
TC (mmol/L)	3.2 ± 0.2[a]	10.6 ± 0.4[b]	11.0 ± 0.6[b]	9.7 ± 0.4[b]	11.2 ± 0.2[b]
HDLC (mmol/L)	1.82 ± 0.06[a]	2.70 ± 0.17[b]	2.90 ± 0.14[b]	2.63 ± 0.27[b]	2.94 ± 0.12[b]
LDLC (mmol/L)	1.43 ± 0.15[a]	7.90 ± 0.48[b]	8.15 ± 0.66[b]	7.08 ± 0.51[b]	8.34 ± 0.34[b]
TG (mmol/L)	0.82 ± 0.06[a]	2.30 ± 0.41[b]	2.54 ± 0.17[b]	2.03 ± 0.23[b]	2.66 ± 0.28[b]
Glucose (mmol/L)	6.36 ± 0.32[a]	9.40 ± 0.66[b]	9.15 ± 0.27[b]	8.22 ± 0.73[b]	9.18 ± 0.50[b]
Insulin (pmol/L)	140 ± 21[a]	411 ± 109[b]	395 ± 98[b]	206 ± 23[a]	246 ± 28[a]
HOMA-IR	5.7 ± 0.7[a]	24.8 ± 1.3[b]	23.1 ± 2.3[b]	10.9 ± 1.7[c]	14.4 ± 1.2[c]

[a]Values are mean ± SEM ($n = 8$). For each dietary treatment, means in a row with different letters differ, $P < 0.05$. Plasma total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDLC), LDL-cholesterol (LDLC), triglycerides (TG), glucose, insulin and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) were measured after overnight fasting, at the end of the 13-week treatment period.

order to gain insight into the mechanisms underlying the antioxidant and anti-inflammatory effects ascribed to these phenolics.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Lucigenin, sodium cacodylate, hematoxylin, eosin, paraoxon, paraformaldehyde, glutaraldehyde and Oil Red O were from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Materials. Vineatrol 30 is a grapevine-shoot extract developed and manufactured by Actichem (Montauban, France) that contains considerable amounts of resveratrol and its oligomers, as follows: 15.2% resveratrol, 13.2% ε-viniferin, 4.4% ampelopsin A, 2.8% hopeaphenol, 2.1% iso-*trans*-ε-viniferin, 1.9% vitisin A, 1.9% vitisin B, 1.8% piceatannol, and 1.6% miyabenol C.[18]

Animals, Diets, and Experimental Design. Forty male weanling Golden Syrian hamsters (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) weighing ~65 g each were randomly divided into five groups of 8 animals. They were housed at 23 ± 1 °C, subjected to a 12 h light/dark cycle and handled in compliance with European Union rules and according to the guidelines of the NIH[19] and the Committee for Animal Care at the University of Montpellier (France). Four groups were fed with a high-fat atherogenic diet (HF), consisting of 200 g/kg casein, 3 g/kg L-methionine, 393 g/kg corn starch, 33 g/kg maltodextrin 10, 154 g/kg sucrose, 50 g/kg cellulose, 100 g/kg hydrogenated coconut oil (21.2% energy of the diet), 2 g/kg cholesterol, 35 g/kg mineral mix and 10 g/kg vitamin mix, for 13 weeks. The four HF groups were given daily by gavage either tap water (control group, C) or an aqueous solution of Vineatrol 30 at a dose of 0.04 mg/kg body weight (BW)/d (VT1), 0.2 mg/kg BW/d (VT2) or 1 mg/kg BW/d (VT3). The volume of solutions force-fed was 1 mL/(d/hamster). For reference, the fifth group was given a standard diet (S) consisting of 236 g/kg casein, 3.5 g/kg L-methionine, 300 g/kg corn starch, 30 g/kg maltodextrin 10, 290.5 g/kg sucrose, 50 g/kg cellulose, 45 g/kg vegetable oil (10.3% energy of the diet), 35 g/kg mineral mix and 10 g/kg vitamin mix. Vitamin and mineral mixes were formulated according to AIN-93 guidelines.[20] This group was also given tap water daily by gavage.

Analytical Procedures. At the end of the experimental period (13 weeks), the hamsters were deprived of food overnight and fasting blood samples were collected by cardiac puncture. Plasma was prepared by centrifugation at 2000*g* for 10 min. Plasma total cholesterol (TC) and HDL cholesterol (HDL-C) were determined using commercially available enzymatic kits (CH 200 and CH 203, respectively, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, U.K.). Very low- and low-density lipoprotein cholesterol in the plasma were precipitated using phosphotungstate reagent,[21] and HDL-C was measured in the supernatant. Plasma triglycerides (TG) were measured using a Randox enzymatic kit (TR 1697) and glucose levels by means of an enzymatic technique (KonePro, KoneLab, Evry-Les-Lys, France) using reagents from the Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France).

Paraoxonase activity (PON) was determined using paraoxon as a substrate and measured by the increase in absorbance at 412 nm due to the formation of 4-nitrophenol, according to the technique of Jaouad et al.[22]

Plasma insulin concentrations were determined using commercially available ELISA kits (Mercodia AB, Uppsala, Sweden); the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated from insulin and glucose values using the formula of Matthews et al.:[23] HOMA-IR = Fasting glucose (mmol/L) × fasting insulin (mU/L)/22.5.

Plasma adiponectin and leptin concentrations were assessed using immunoassay kits (R&D Systems, Lille, France).

The liver was excised, weighed, and sectioned; some samples were removed for histology, while others were stored at −80 °C until further use. For pathological analysis, liver samples were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde and paraffin embedded, and 3 μm-thick serial sections were prepared. Sections were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin.

Unfixed liver samples were homogenized in ice-cold 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4) and the homogenate was spun at 13 000*g* for 15 min at 4 °C. Liver TNF-α and IL-6 levels were quantified using specific ELISA kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Lille, France).

Hepatic superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production was evaluated by the intensity of lucigenin-enhanced chemiluminescence (10 μM lucigenin), measured with a luminometer (Perkin-Elmer Wallac, Victor, Turku, Finland) as previously described.[24] Results were expressed as relative luminescence units (RLU) per milligram of protein.

Following blood collection and liver removal, the intact aortic arch was first perfused with phosphate buffered saline containing 1 mmol/L $CaCl_2$ and 15 mmol/L glucose for 5 min, and then with 0.1 mmol/L sodium cacodylate buffer, pH 7.4, containing 2.5 mmol/L $CaCl_2$, 2.5% paraformaldehyde and 1.5% glutaraldehyde, in order to fix the vasculature. The aorta was carefully dissected and processed as previously described, and lipids were stained with Oil Red O according to the protocol of Auger et al.[12] An Olympus microscope equipped with an image acquisition and analysis system (Image J, Scion Corporation, Frederick, MD) was used to capture and analyze the total Oil Red O-stained area for each aortic arch. The area covered by foam cells (aortic fatty streak area or AFSA) was expressed as a percentage of the total area surveyed.

Statistical Analysis. Data are shown as means ± SEM. Statistical analysis of the data was carried out using StatView IV software (Abacus Concepts, Berkeley, CA), with a one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference test. A *p*-value of ≤0.05 was taken to indicate a significant difference.

RESULTS

Food Intake and Body Weight. No significant difference in food intake or body weight gain was found between the control group (C) fed the HF diet alone, and groups VT1–VT3, fed Vineatrol 30 in addition to the HF diet. However, food intake and body weight gain were significantly lower in standard-diet-fed hamsters (S) (Table 1).

Plasma Analysis. The HF diet produced a significant increase in plasma lipid and glucose concentrations in group C compared with those in group S (Table 1). Regardless of the dose used, Vineatrol 30 did not induce any improvement in these parameters.

In the plasma, PON is localized in the HDL fraction. The HF diet (group C) strongly reduced the ratio of PON activity to HDL by about 56% ($P < 0.0001$) in comparison to the standard diet (Figure 1). Vineatrol 30 at 1 mg/(kg BW/day) (VT3) was the only dose that was effective at significantly improving PON activity in HF-fed groups, by about 29% ($P = 0.0052$).

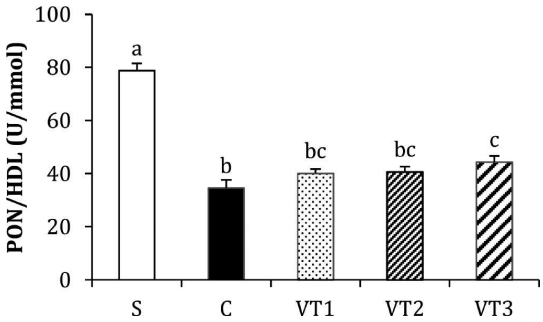


Figure 1. Paraoxonase activity ratio (PON/HDL) in hamsters fed a standard diet (S), a high-fat diet (C), or a high-fat diet plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2) or 1 mg/(kg BW/day) (VT3), for 13 weeks. Values indicate means ± SEM ($n = 8$). For each dietary treatment, bars with different index letters are significantly different ($P < 0.05$).

Cardiac and Liver Biomarkers of Oxidative Stress. In the liver, $O_2^{\bullet-}$ production increased 52% in group C when compared to group S ($P = 0.0066$), but was significantly decreased (by 40% on average) in groups given Vineatrol 30 (VT1–3) when compared to group C (Figure 2).

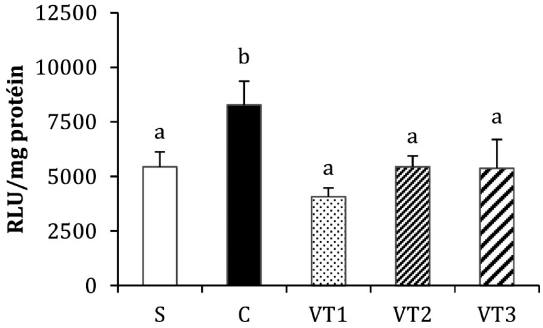


Figure 2. Liver NAD(P)H oxidase activity in hamsters fed a standard diet (S), a high-fat diet (C), or a high-fat diet plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2) or 1 mg/(kg BW/day) (VT3), for 13 weeks. Values indicate means ± SEM ($n = 8$). For each dietary treatment, bars with different index letters are significantly different ($P < 0.05$).

Average aortic fatty streak area (AFSA), or the area stained by Oil Red O expressed as a percentage of the total area surveyed (Figures 3 and 4), progressively decreased in hamsters given 0.04–1.0 mg/(kg/day) Vineatrol 30 (VT1–3) in comparison with group C. Groups VT1 and VT2 displayed less important AFSA decreases (14%, NS and 39%, $P = 0.0187$, respectively) than VT3, which exhibited a 67% reduction ($P = 0.0004$) in the AFSA when compared to group C. As expected, only traces of lipid deposits were seen in the standard diet-fed group, S (0.2 ± 0.0%).

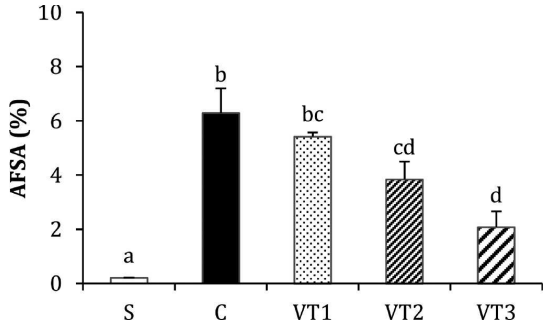


Figure 3. Aortic fatty streak area (AFSA) in hamsters fed a standard diet (S), a high-fat diet (C), or a high-fat diet plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2) or 1 mg/(kg BW/day) (VT3), for 13 weeks. Values indicate means ± SEM ($n = 8$). For each dietary treatment, bars with different index letters are significantly different ($P < 0.05$).

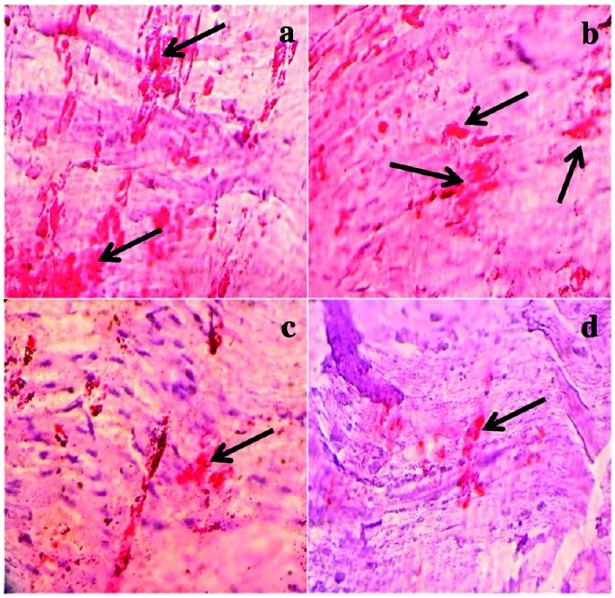


Figure 4. Photomicrographs of sections of the surface of the aortic arch stained with Oil Red O, in hamsters after 13 weeks of an atherogenic diet (a) or an atherogenic diet supplemented with Vineatrol 30, i.e., VT1 (b), VT2 (b), VT3 (c). The images show examples of the aortic arch surface covered by lipid inclusions in the intima, colored red by Oil Red O (arrows). The standard group (not shown here) showed only traces of lipid droplets. In contrast, lipid droplets are extensively distributed in the control group (C). The quantification of fatty streaks is summarized in Figure 3. All photomicrographs have the same scale.

Liver Steatosis and Inflammation. Standard diet-fed hamsters (group S) did not exhibit any histological evidence of hepatic steatosis or fibrosis (Figure 5a). In contrast, the presence of microvesicular steatosis of moderate to severe intensity was noted in group C, accompanied by an inflammatory reaction resulting in the presence of polymorphonuclear cells (Figure 5b). No marked reduction in the degree of steatosis was noted in the livers of HF-fed hamsters treated with any dose of Vineatrol 30 (Figure 5c). However, polymorphonuclear cells could no longer be observed.

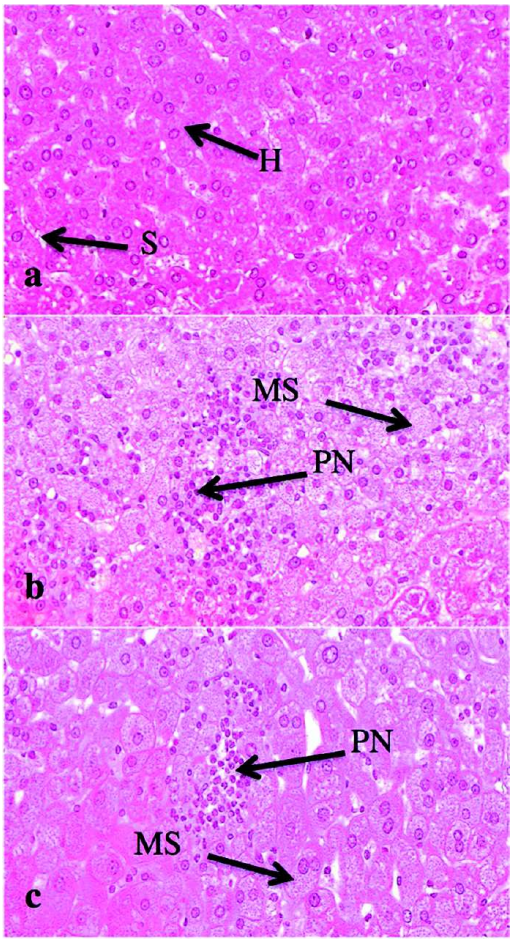


Figure 5. Histological evaluation of hepatic steatosis in standard diet-fed (a), high-fat atherogenic diet-fed (b), or Vineatrol 30-treated (1 mg/(kg BW/day); group VT3; (c)) hamsters after 13 weeks. Representative liver sections (40× magnification) are illustrated. Atherogenic hamsters fed with no Vineatrol 30 (b) illustrate the development of moderate to severe hepatic steatosis, along with inflammation indicated by the widespread presence of polynuclear cells, when compared to standard diet-fed animals (a). (c) Hepatic steatosis is not affected in Vineatrol-fed hamsters, although polynuclear cells are reduced compared to control animals (b). Sinusoidal capillary (S); hepatocyte (H); microvascular steatosis (MS); polynuclear cells (PN).

The concentrations of IL-6 and TNF-α in the liver of group C hamsters were significantly increased (by 26%, P = 0.0096 and 28%, P = 0.0103, respectively) in comparison with concentrations in group S hamsters (Figure 6). This low-grade inflammatory state was only reversed significantly by the ingestion of the highest dose of Vineatrol (group VT3), which led to a slight reduction in the concentration of IL-6 (P = 0.0438) and TNF-α (P = 0.0318) by 18% and 28% compared to group C, respectively. No change in inflammatory status was seen in groups VT1 and VT2.

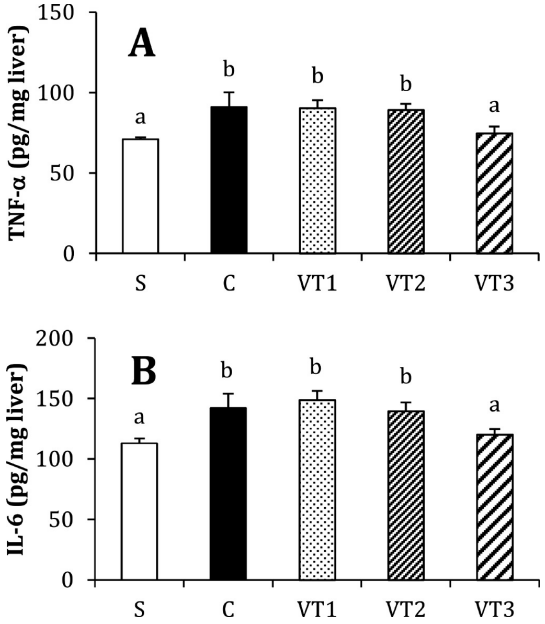


Figure 6. Inflammatory state indexed by cytokine concentrations in the liver: TNF-α (A) and IL-6 (B) in hamsters fed a standard diet (S), a high-fat diet (C), or a high-fat diet plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2), or 1 mg/(kg BW/day) (VT3), for 13 weeks. Values indicate means ± SEM (n = 8). For each dietary treatment, bars with different index letters are significantly different (P < 0.05).

Blood Metabolic Markers. The feeding of hamsters with a HF diet led to a 47% higher fasting plasma concentration of glucose (P = 0.0056) (Table 1) and a 3-fold increase in the concentration of insulin (P = 0.0058) (Table 1) leading to an insulin resistance in group C compared to group S (P < 0.0002). Although Vineatrol 30 did not influence glycemia, it induced a significant decrease in plasma insulin (45% on average compared to group C) at 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2) (P = 0.0244) and 1 mg/(kg BW/day) (VT3) (P = 0.0309). Despite this, Vineatrol 30 at 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2) and 1 mg/(kg BW/day) (VT3) induced a significant lowering of HOMA-IR value (Table 1) that however remained higher than baseline values.

Hamsters in group C also exhibited slight but significantly higher leptin levels (23%, P = 0.0001) than those in group S (Figure 7), and adiponectin level was not modified. Giving Vineatrol 30 by gavage significantly improved the adipokine pattern by partially preventing the leptin increase (P = 0.0103). However, adiponectin levels were not significantly modified and stood close to baseline values.

DISCUSSION

This study provides evidence for the first time that dietary supplementation with a grapevine-shoot extract rich in resveratrol and its oligomers protects against diet-induced oxidative stress and atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. No evidence of toxicity or other unwanted

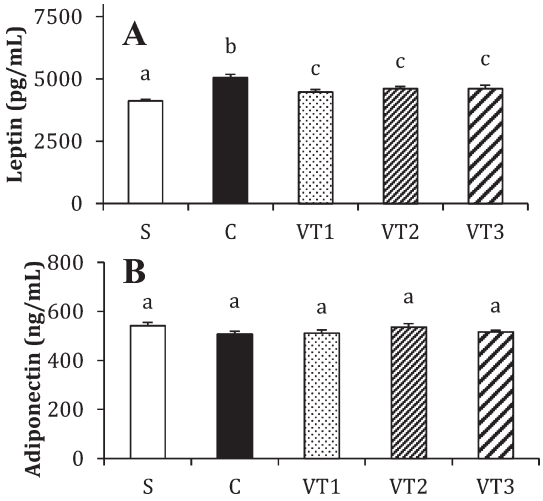


Figure 7. Plasma leptin (A) and adiponectin levels (B) in hamsters fed a standard diet (S), a high-fat diet (C), or a high-fat diet plus Vineatrol 30 at 0.04 mg/(kg BW/day) (VT1), 0.2 mg/(kg BW/day) (VT2), or 1 mg/(kg BW/day) (VT3), for 13 weeks. Values indicate means ± SEM (n = 8). For each dietary treatment, bars with different index letters are significantly different ($P < 0.05$).

pharmacological effects of Vineatrol 30 was noted, indicating that at the doses used here, Vineatrol 30 could be a safe nutraceutical supplement.

As previously reported, the HF diet led to an increase in plasma cholesterol levels after 13 weeks, that in turn led to lipid deposition in the aortic arch. Interestingly, this diet-induced hypercholesterolemia was accompanied by a tendency to superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) overproduction, in agreement with previous studies in the hamster model of atherosclerosis.[24] According to the oxidative hypothesis of atherosclerosis, it is postulated that NAD(P)H oxidase works with high LDL cholesterol levels to induce foam cell fatty streak deposition and subsequent atherosclerosis.[25] Here, the reduction of both $O_2^{\bullet-}$ production and AFSA by Vineatrol 30 further supports this hypothesis. Moreover, $O_2^{\bullet-}$ production in the liver is closely dependent on the activity of the NAD(P)H oxidase subunit $p22^{phox}$.[15] In agreement with this, liver production of $O_2^{\bullet-}$ was decreased by 40% on average in animals fed with Vineatrol 30, that is, a return to production levels observed in standard diet-fed animals.

PON activity is a marker of oxidative stress. It has been proposed that PON plays a crucial role in the antioxidant activity of HDL.[26] This protection is most probably related to the ability of PON to hydrolyze oxidized phospholipids [27] and/or lipid peroxidation products.[28] PON is therefore believed to be a protective factor against atherosclerosis, and some studies have shown that PON can reduce oxidative stress in aortic lesions.[29] In the current study, only the highest dose of Vineatrol 30 was effective in increasing PON activity (Figure 1). This is consistent with a reduced AFSA in VT3 animals (Figure 3), even if there is no statistical difference between VT2 and VT3 group. Vineatrol 30 reduced the production of liver $O_2^{\bullet-}$ levels (Figure 2), possibly via the decreased activity of NAD(P)H oxidase and, therefore, the oxidative stress induced by the atherogenic diet. While this effect was independent of dose, it does suggest an antioxidant effect of Vineatrol 30, at least at the systemic level. This is in accordance with previous data from Müller et al.[18] showing that Vineatrol 30 enhances the gene-promoting activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase in the fibroblast cell line V79 in Chinese hamster, while this effect could not be demonstrated with resveratrol alone. The daily consumption of Vineatrol 30 for 13 weeks resulted in substantially lower fatty streak deposition in the arteries of VT1−3 hamsters compared to controls, with stronger effects at higher doses (0.2 or 1 mg/(kg BW/day)) (Figures 3 and 4). This marked limitation of the onset of atherosclerosis was not associated with any significant change in the plasma cholesterol profile, in keeping with the demonstration by Andrews et al.[30] that absolute cholesterolemia is not pivotal in determining the extent of aortic fatty streak deposition. However, it has been shown in the fibroblast cell line V79 that Vineatrol 30 inhibits lipid peroxidation.[18] These results thus strengthen the hypothesis that the oxidation of LDL is implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. This could explain, at least in part, the effects of Vineatrol 30 or its phenolic components (resveratrol and its oligomers and ε-viniferin) on aortic atherosclerosis. Resveratrol and ε-viniferin are the most important components of Vineatrol 30. One of the most well-known benefits of resveratrol is for cardiovascular health.[31] Resveratrol, at nutritional doses, increases the expression in human vascular endothelial cells of eNOS.[32] As well, it decreases the expression of the potent vasoconstrictor endothelin.[32] This involved SIRT1 activation, coupled with a decrease in mitochondrial uncoupling protein 2 and an increase in mitochondrial ATP synthesizing efficiency.[33] Resveratrol has been considered as a potent activator of SIRT1. More recently, it has been shown that ε-viniferin increases mitochondrial Sirtuin 3 (SIRT3) in models of Hungtinton disease, an inherited neurodegenerative disorder caused by an abnormal polyglutamine expansion in the protein Huntingtin (Htt), and it has been suggested that SIRT3 mediates the neuroprotection of viniferin.[34] Elsewhere, we have shown that Vineatrol 30 increases SIRT1 expression in senescent fibroblasts in a dose-dependent manner, that is, 48% and 66% at 0.25 and 1.00 μg/mL medium, respectively.[35] Thus, a possible mechanism by which Vineatrol 30 is eliciting its effect could be SIRT-dependent. However, it should be kept in mind that other complex mechanisms may be involved since resveratrol could exert its cardioprotective effects by inhibition of platelet aggregation and its antioxidant effects on cholesterol metabolism,[31] and since ε-viniferin is more effective than its monomer resveratrol in improving the functions of vascular endothelial cells and the heart.[16] Therefore, the observed effects most likely result of a synergistic action of Vineatrol 30 components.

Kleemann et al.[36] have demonstrated that dietary cholesterol is not only a lipid risk factor but also a trigger for hepatic inflammation and, as such, also involved in the evolution of the inflammatory arm of atherosclerotic disease. Here, dietary cholesterol could result in an inflammatory pro-atherogenic response that enhances early lesion formation. The early presence of polynuclear cells in liver tissue at the time of manifest insulin resistance (HOMA-IR; Table 1) raises the hypothesis that these cells may orchestrate the inflammatory process in liver tissue with the subsequent development of IR. The body weight of hamsters in groups C, VT1, VT2 and VT3 was not different, suggesting that the weight of fat was not either. In addition, in group C, there was a significant leptin/adiponectin imbalance, even if small. Classically, leptin reduces ectopic fat accumulation in nonadipose tissues, enhancing

insulin mediated stimulation of glucose disposal,[37] and leptinemia increased here in C group. Moreover, adiponectin promotes fatty acid oxidation in muscle and inhibits liver glucose production,[38] and adiponectinemia was reduced here in C group. Thus, leptin and adiponectin may work hand in hand to sensitize peripheral tissues to insulin. This is what we showed a previous work on diet induced obesity in hamsters receiving a high fat diet (HFD)[39] leading to high plasma glucose, insulin and greater insulin resistance (HOMA-IR) values. A phenolic grape seed extract rich in proanthocyanidins (GSE) prevented in part these effects, reducing insulinemia and leptinemia, whereas adiponectin level increased compared with obese controls. It lowered glycemia and HOMA-IR. Here, variations of adipocytokines are less pronounced in group C because we did not use a model of obesity. It is also possible that procyanidins from grape seeds are most effective in restoring the imbalance leptin/adiponectin than resveratrol and its oligomers.

This condition of leptin/adiponectin imbalance in group C led to low-grade inflammation (increased liver polynuclear cells, TNF-α and IL-6) and oxidative stress (high $O_2^{\bullet-}$ production probably due to increased NAD(P)H oxidase activity). Moreover, IL-6 has been postulated by Yudkin et al.[40] to play a key role in the development of coronary heart disease, among numerous inflammatory modulators and inflammasome. Vineatrol 30 showed a beneficial effect on all these parameters at the highest dose used (group VT3). This could be attributed at least to resveratrol, since recent data suggest that dietary resveratrol and polyphenolic preparations suppress the oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate diet hence reducing the severity of local inflammation.[41]

Steatosis-derived radical oxygen species, possibly resulting from the overactivity of NAD(P)H oxidase[42] (as measured here in the control group), increased fatty acid oxidation, and the attendant hepatocyte injury and cytokine release, are likely to perpetuate the liver damage caused by steatosis and add more atherogenic stimuli to the already high oxidative status. The steatosis observed here was a simple fat overload corresponding to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), according to Figure 4. Schwimmer et al.[43] hypothesized that fatty liver is a risk factor for the early onset of atherosclerosis, independent of other prognostic factors. This suggests a more complex amplification loop involving the intertwined relationships between NAFLD and atherosclerosis. The possible biological mechanisms linking NAFLD and accelerated atherosclerosis are still poorly known. NAFLD in its more advanced forms might act as a trigger for further increasing whole-body insulin resistance and dyslipidemia, leading to accelerated atherosclerosis. Here, the insulinemia and glycemia of group C hamsters match those in a state of insulin resistance, and this can be put in parallel with the close linear relationship between liver fat content and direct measures of hepatic insulin sensitivity.[44] Only the highest doses of Vineatrol 30 (VT2 and VT3) improve the state of IR, but they do not allow to reach the baseline values. Another possible mechanism underlying NAFLD and atherosclerosis could be the link between increased oxidative stress and chronic subclinical inflammation, which are thought to be causal factors in the progression to more advanced forms of NAFLD.[45] To our knowledge, using such a diet-induced atherosclerosis in hamsters, there was never any evidence of inflammation or imbalance of leptin/adiponectin. This is what we have researched and shown here in the group of controls, although the change rates of pro-inflammatory cytokines and adipocytokines are not very important. This suggests that these animals develop early atherosclerosis but that metabolic syndrome has not yet fully installed.

In conclusion, we have demonstrated here for the first time that the grapevine-shoot extract Vineatrol 30 is capable of strongly inhibiting aortic fatty streak deposition in hamsters fed an atherogenic diet, through antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. As discussed by others,[18,46] the individual polyphenols present in the extract could act synergistically, eliciting a strong beneficial effect by preventing the progression of the lesions observed in this hamster model of atherosclerosis. Because of the central role of oxidative stress and inflammation in disease pathogenesis and progression, the use of antioxidants as therapeutic agents to counteract cardiac and liver damage supports the potential use of Vineatrol 30 as a dietary supplement.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Address: UMR NUTRIPASS, CC 023, Université Montpellier Sud de France, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Phone/Fax: +33 0467143521. E-mail: jm.rouanet@univ-montp2.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

(1) Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1685−1695.

(2) Steinberg, D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 995−998.

(3) Van Gaal, L. F.; Mertens, I. L.; De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **2006**, *444*, 875−880.

(4) Yoneda, M.; Mawatari, H.; Fujita, K.; Iida, H.; Yonemitsu, K.; Kato, S.; Takahashi, H.; Kirikoshi, H.; Inamori, M.; Nozaki, Y.; Abe, Y.; Kubota, K.; Saito, S.; Iwasaki, T.; Terauchi, Y.; Togo, S.; Mayema, S.; Nakajima, A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 573−582.

(5) Hiroi, S.; Harada, H.; Nishi, H.; Satoh, M.; Nagai, R.; Kimura, A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with non-familial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 332−339.

(6) Adams, L. A.; Angulo, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Med.* **2005**, *22*, 1129−1133.

(7) Shamir, R.; Hartman, C.; Karry, R.; Pavlotzky, E.; Eliakim, R.; Lachter, J.; Suissa, A.; Aviram, M. Paraoxonases (PONs) 1, 2 and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *39*, 336−344.

(8) Rosenblat, M.; Karry, R.; Aviram, M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis* **2006**, *187*, 74−81.

(9) Aviram, M.; Hardak, E.; Vaya, J.; Mahmood, S.; Milo, S.; Hoffman, A.; Billicke, S.; Draganov, D.; Rosenblat, M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* **2000**, *101*, 2510−2517.

(10) Mackness, B.; Mackness, M. I.; Durington, P. N.; Arrol, S.; Evans, A. E.; McMaster, D.; Ferrières, J.; Ruidavets, J. B.; Williams, N. R.; Howard, A. N. Paraoxonase activity in two healthy population with

differing rates of coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, *30*, 4−10.

(11) Auger, C.; Caporiccio, B.; Landrault, N.; Teissèdre, P. L.; Laurent, C.; Cros, G.; Besançon, P.; Rouanet, J. M. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B, and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters (Mesocricetus auratus). *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1207−1213.

(12) Auger, C.; Teissèdre, P. L.; Gérain, P.; Lequeux, N.; Bornet, A.; Serisier, S.; Besançon, P.; Caporiccio, B.; Cristol, J. P.; Rouanet, J. M. Dietary wine phenolics catechin, quercetin and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2015−2021.

(13) Wang, Z.; Zou, J.; Coa, K.; Hsieh, T. C.; Huang, Y.; Wu, J. M. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16*, 533−540.

(14) Nadtochiy, S. M.; Redman, E. K. Mediterranean diet and cardioprotection: the role of nitrite, polyunsaturated fatty acids, and polyphenols. *Nutrition* **2011**, *27*, 733−744.

(15) Décordé, K.; Ventura, E.; Lacan, D.; Ramos, J.; Cristol, J. P.; Rouanet, J. M. An SOD rich melon extract Extramel prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *20*, 301−307.

(16) Zghonda, N.; Yoshida, S.; Araki, M.; Kusunoki, M.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Miyazaki, H. Greater effectiveness of ε-viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1259−1267.

(17) Csiszar, A.; Smith, K.; Labinskyy, N.; Orosz, Z.; Rivera, A.; Ungvari, Z. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H1694−H1699.

(18) Müller, C.; Ullman, K.; Wilken, A.; Winterhalter, P.; Toyokuni, S.; Steinberg, P. Potent antioxidative activity of Vineatrol® 30 grapevine-shoot extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *78*, 1831−1836.

(19) National Research Council. *Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals*; National Institutes of Health Publication no.85-123 (rev.); U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1985.

(20) Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939−1951.

(21) Weingand, K. W.; Daggy, B. P. Quantitation of high-density lipoprotein cholesterol in plasma from hamsters by differential precipitation. *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 575−580.

(22) Jaouad, L.; de Guise, C.; Berrougui, H.; Cloutier, M.; Isabelle, M.; Fulop, T.; Payette, H.; Khalil, A. Age-related decrease in high density lipoprotein antioxidant activity is due to an alteration on the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* **2006**, *185*, 191−200.

(23) Matthews, D. R.; Hosker, J. P.; Rudenski, A. S.; Naylor, B. A.; Treacher, D. F.; Turner, R. C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412−419.

(24) Sutra, T.; Décordé, K.; Riss, J.; Dallas, C.; Cristol, J. P.; Rouanet, J. M. A commercial extract of fruits and vegetables, Oxxynea, acts as a powerful antiatherosclerotic supplement in an animal model by reducing cholesterolemia, oxidative stress, and NADPH oxidase expression. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4258−4263.

(25) Heinloth, A.; Heermeier, K.; Raff, U.; Wanner, C.; Galle, J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, *11*, 1819−1825.

(26) Durrington, P. N.; Mackness, B.; Mackness, M. I. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Dis.* **2001**, *21*, 473−480.

(27) Watson, A. D.; Berliner, J. A.; Hama, S. Y.; La Du, B. N.; Faull, H. K.; Fogelman, A. M.; Navab, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase—Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 2882−2891.

(28) Aviram, M.; Billecke, S.; Sorenson, R.; Bisgaier, C.; Newton, R.; Rosenblat, M.; Erogul, J.; Hsu, C.; Dunlop, C.; La Du, B. N. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities - Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1998**, *18*, 1617−1624.

(29) Mackness, B.; Mackness, M. I.; Durington, P. N.; Arrol, S.; Evans, A. E.; McMaster, D.; Ferrieres, J.; Ruidavets, J. B.; Williams, N. R.; Howard, A. N. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, *30*, 4−10.

(30) Andrews, B.; Burnan, K.; Paganga, G.; Browse, N.; Rice-Evans, C.; Sommerville, K.; Leake, D.; Taub, N. Oxidisability of low density lipoproteins in patients with carotid or femoral artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1995**, *112*, 77−84.

(31) Markus, M. A.; Morris, B. J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin. Interventions Aging* **2008**, *3*, 331−339.

(32) Nicholson, S. K.; Tucker, J. A.; Brameld, J. M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc. Nutr. Soc.* **2008**, *67*, 42−47.

(33) Della-Morte, D.; Dave, K. R.; Defazio, R. A.; Bao, Y. C.; Raval, A. P.; Perez-Pinzon, M. A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* **2009**, *159*, 993−1002.

(34) Fu, J.; Jin, J.; Cichewicz, R. H.; Hageman, S. A.; Ellis, T. K.; Xiang, L.; Peng, Q.; Jiang, M.; Arbez, N.; Hotaling, K.; Ross, C. A.; Duan, W. trans-(-)-{epsilon}-viniferin increases mitochondrial Sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington disease. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24460−24472.

(35) Izard, J. C. Grapevine resveratrol derivatives: health and beauty benefits. First International Conference of Resveratrol and Health, Copenhagen, September 13−15, 2010.

(36) Kleemann, R.; Verschuren, L.; van Erk, M. J.; Nikolsky, Y.; Cnubben, N. H. P.; Verheij, E. R.; Smilde, A. K.; Hendriks, H. F. J.; Zadelaar, S.; Smith, G. J.; Kaznacheev, V.; Nikolskaya, T.; Melnikov, A.; Hurt-Camejo, Z.; van der Greef, J.; van Ommen, B.; Kooistra, T. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R200.

(37) Yaspelkis, B. B.; Singh, M. K.; Krisan, A. D.; Collins, D. E.; Kwong, C.; Bernard, J. R.; Crain, A. M. Chronic leptin treatment enhances insulinstimulated glucose disposal in skeletal muscle of high-fat-fed rodents. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1801−1816.

(38) Pajvani, U. B.; Scherer, P. E. Adiponectin: Systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr. Diabetes Rep.* **2003**, *3*, 207−213.

(39) Décordé, K.; Teissèdre, P. L.; Sutra, T.; Ventura, E.; Cristol, J. P.; Rouanet, J. M. Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 659−666.

(40) Yudkin, J. S.; Kumari, M.; Humphries, S. E.; Mohamed-Ali, V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* **2000**, *148*, 209−214.

(41) Ghanim, H.; Sia, C. L.; Korzeniwski, K.; Lohano, T.; Abuaysheh, S.; Marumganti, A.; Chaudhuri, A.; Dandona, P. A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 1409−1414.

(42) De Minicis, S.; Brenner, D. A. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *23* (S1), S98−S103.

(43) Schwimmer, J. B.; Deutsch, R.; Behling, C.; Lavine, J. E. Fatty liver as a determinant of atherosclerosis. *Hepatology* **2005**, *42* (S1), 610A [abstract].

(44) Yki-Jarvinen, H.; Westerbacka, J. The fatty liver and insulin resistance. *Curr. Mol. Med.* **2005**, *5*, 287−295.
(45) Adams, L. A.; Angulo, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Med.* **2005**, *22*, 1129−1133.
(46) Billard, C.; Izard, J. C.; Roman, V.; Kern, C.; Mathiot, C.; Mentz, F.; Kolh, J. P. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1991−2002.

C Etude 2 : Effets préventifs de la spiruline enrichie en silicium sur le modèle hamster Syrien doré athéromateux

C.1 But de l'étude 2

La spiruline, qui fait partie des rares algues autorisées en tant que complément sur le marché alimentaire, possède des qualités nutritionnelles exceptionnelles. Elle est très riche en protéines hautement digestibles (70 %). Elle est également une très bonne source de lipides, glucides, vitamines et minéraux. Ses effets bénéfiques pour la santé ne sont plus à démontrer. De plus cette algue a la faculté d'incorporer des oligoéléments afin de les rendre hautement biodisponibles.
Bien que le silicium soit le deuxième élément le plus abondant sur Terre, sa faible biodisponibilité pour l'homme, fait qu'il est très peu étudié dans le domaine biologique. Cependant, il a clairement été établi que l'on retrouve du silicium dans de nombreux organes, ce qui en fait un élément important. De plus, sa diminution dans l'organisme est directement liée avec l'apparition de certaines pathologies et notamment des maladies cardiovasculaires.

L'incorporation du silicium dans la spiruline pourrait être un moyen de produire un complément alimentaire biodisponible. Ainsi, en lien avec les effets bénéfiques du silicium et les propriétés hypolipémiantes, antioxydantes et anti-inflammatoires de la spiruline, nous nous sommes concentrés sur un modèle d'athérosclérose précoce pour déterminer les effets de la supplémentation en spiruline enrichie en silicium.
Nous avons évalué les effets bénéfiques potentiels de la spiruline enrichie en silicium sur certains troubles et dysfonctionnements majeurs induits par un régime athéromateux, dit régime « high fat », chez le hamster Syrien doré.
Deux groupes de hamsters servent de contrôle : un groupe standard (STD) nourri avec le régime standard précédemment décrit (contrôle négatif) et un groupe contrôle (HF) recevant le régime high fat (contrôle positif). Deux groupes sont supplémentés avec la spiruline enrichie en silicium à 57 mg / kg / jour : un groupe recevant un régime standard (STD-SES) et un groupe nourri avec le régime athéromateux (HF-SES). Enfin deux autres groupes sont supplémentés avec de la spiruline brute (non enrichie) à 57 mg / kg / jour : un groupe recevant un régime standard (STD-Sp) et un groupe nourri avec le régime athéromateux (HF-Sp).

Nous avons établi la dose de silicium en nous basant sur les références données par l'EFSA, c'est-à-dire 40 mg de silicium / jour chez l'homme, soit 0,57 mg de silicium / kg / jour, quantité contenue dans la spiruline enrichie en silicium administrée aux hamsters. Les doses sont données de façon préventive pendant douze semaines.

Les paramètres évalués sont la dyslipidémie et les dérèglements potentiellement induits par le régime athéromateux (le stress oxydant et la résistance à l'insuline). Le développement d'une stéatose hépatique est également recherché ainsi que la présence d'un état inflammatoire de bas niveau. Enfin, les propriétés contractiles de l'artère ont été évaluées.

C.2 Article 2

Article soumis, Nutrition, Janvier 2015.

*De: *"Jan Frank" <jan.frank@nutres.de <mailto:jan.frank@nutres.de>>
*À: *jm.rouanet@univ-montp2.fr <mailto:jm.rouanet@univ-montp2.fr>
*Date: *25 mars 2015 22:17:24 UTC+1
*Objet: **Your Submission NUT-D-14-00813R2*

Ms. Ref. No.: NUT-D-14-00813R2
Title: Dietary silicon-rich spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high-fat diet
Nutrition

Dear Prof. Rouanet,

I am delighted to inform you that your paper "Dietary silicon-rich spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high-fat diet" has been accepted for publication in Nutrition.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly.
We look forward to publishing your paper and thank you for your contribution and interest in Nutrition.

Kind regards,

Jan Frank, Ph.D.
Co-Regional Editor
Nutrition

==========

Nutrition in your in-box
Please be sure to go to www.nutritionjrnl.com <http://www.nutritionjrnl.com> and click on the "add table of contents alert" link to register or log-in to the Nutrition website to sign up to receive each issue's table of contents via email as it becomes available. You can also sign up to receive periodic articles in press alerts to learn when individual articles are posted on the Journal website.

Dietary silicon-rich spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high-fat diet

Joris Vidé[a], PhD, Anne Virsolvy[b], PhD, Cindy Romain[a], PhD,
Jeanne Ramos[c], PhD, Nicolas Jouy[d], PhD, Sylvain Richard[b], PhD, Jean-Paul Cristol[a], PhD,
Sylvie Gaillet[a,1], PhD, Jean-Max Rouanet[a,1,*], PhD

[a] Nutrition & Metabolism, UMR 204 NUTRIPASS, Prevention of Malnutritions & Linked Pathologies, University Montpellier South of France, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France.

[b] INSERM U1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, Montpellier F-34295, France

[c] Anatomy-Pathology, Guy de Chauliac Hospital-University Center, 34095 Montpellier, France.

[d] Phyco-Biotech, Rue Maurice Béjart, 34184 Montpellier, France.

* Corresponding author: Jean-Max Rouanet. UMR 204 NutriPass, CC 023, Université Montpellier Sud de France, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Phone/Fax: +33 467 143 521. E-mail: jm.rouanet@univ-montp2.fr

[1] These authors contributed equally to this work.

Running head: silicon-rich spirulina improves atherosclerosis

Key words: hamsters, atherosclerosis, oxidative stress, liver inflammation, silicon-rich spirulina.

Words count (excepted title page, highlights, conflict of interest & acknowledgement): 5041

ABSTRACT

We investigated the effects of dietary silicon-enriched spirulina (SES) on atherosclerosis. Hamsters (6/group) on a high-fat diet (HF) received either SES or not-enriched spirulina (Sp) (both at 57 mg/kg BW/day). This corresponds to 0.57 mg silicon/kg BW/day. HF-diet induced dyslipidemia, insulin resistance (IR), oxidative stress and vascular dysfunction. Compared to HF group, SES attenuated increases of lipemia and prevented IR ($p = 0.001$). SES protected against oxidative stress through a reduction of heart ($p = 0.006$) and liver ($p < 0.0001$) NADPH oxidase activity and by sparing the activity of SOD ($p = 0.0017$) and GPx ($p = 0.01861$). SES decreased inflammation, lowering TNF-α and IL-6 levels, decreasing polymorphonuclear cells and preventing NF-κB activity ($p = 0.0259$). SES corrected plasma level of MCP-1 ($p = 0.0380$), which was increased by the HF-diet. Finally, SES supplementation prevented vascular and endothelial functions assessed respectively by the contractile response to the agonist phenylephrine and the relaxation induced by acetylcholine. In conclusion, SES protects against metabolic imbalance, inflammation, oxidative stress and vascular dysfunction induced by the HF-diet, and could prevent the atherogenic processes. Synergistic effects between spirulina and silicon were observed.

1. Introduction

The cyanobacteria *Spirulina platensis* is commercially available for human consumption. Spirulina represent one of the richest protein sources of plant origin (60-70%), lipids (7%), carbohydrates (20%) and are a good source of vitamins and minerals such as Ca, Mg, P, K, Na and Zn [1]. These microalgae are one of the most potent nutrient sources and are used as nutraceutical food supplements [2] with no toxic side effects [3] although there is insufficient scientific evidence to recommend supplementation in humans. They are particularly suitable for the production of specific bioactive compounds and nutritional elements that they are able to accumulate in an organically bio-transformed form. Several reports have described successful enrichment of spirulina biomass in selenium [4], iron, or chromium. Thus, new kind of food supplements has been developed and could serve as a rich source of trace elements [5]. As reported by Seaborn & Nielsen [6], ample evidence exists to indicate that silicon can be accepted as an essential nutrient for higher animals, including humans.

Silicon is naturally found into insoluble and not bioavailable forms. The main soluble form is orthosilicic acid $Si(OH)_4$, very unstable which tends to polymerize at high concentration, corresponding to the form absorbed by humans either in drinking water and food or appearing after nutrients hydrolysis in the intestine [7]. If dietary intake does not provide enough silicon, the body uses that of the richest organs (aorta, skin, tendons, joints, brain and kidneys), which explains its deficit over the years. Although real dietary deficiencies are not known, a lack of food diversification and low consumption of fruits and vegetables could result in insufficient coverage of the needs. Generally, the main food sources of silicon are bananas, cereal and beer [8, 9]. In humans, the daily intake is about 20-50 mg and the body needs represent 9-14 mg/day [10, 11].

Biological importance of silicon has to be considered in the context of its body distribution. The highest concentrations are found in bone and connective tissues such as aorta, trachea, tendons and skin, where silicon appears as an actor in turnover processes through collagen and elastin synthesis [6]. Silicon supplementation has been reported to have beneficial effects on these tissues and especially bones [12] and skin [13]. In contrast, silicon deficiency has been associated to detrimental effects on bone mineralization and growth [14] or skin elasticity and healing [6]. The importance of silicon has also been demonstrated in cardiovascular pathophysiology and especially in the prevention of atherosclerosis [15].

Studies have shown an inverse relationship between the ingestion of silicon and the development of atherosclerosis [16,17]. Furthermore, silicon supplementation reduces hypertension and increases antihypertensive and antiatherogenic gene expressions in the aorta of spontaneously hypertensive rats [18].

Incorporating silicon into spirulina could be a way to produce a bioavailable food supplement. Thus, in line with the beneficial effects of silicon and the antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory properties of spirulina [19], we focused on a model of early atherosclerosis to evaluate the effects of supplementation with silicon-enriched spirulina. We assessed the potential beneficial preventive effects of silicon-enriched spirulina on some major disorders and dysfunctions induced by a high-fat diet in the Syrian hamster model.

2. Materials and Methods

2.1. Animals, diets and experimental design.

2.1.1. Production of the materials. To produce silicon-rich spirulina (SES), spirulina (produced at PhycoBiotech, Lunel, France) grown in a 130 L photobioreactor under continuous lighting on Zarouk's medium at 22°C and pH 10.5 in the presence of 1 g/L sodium metasilicate (Na_2O_3Si). This medium contained $NaHCO_3$, 16.8 g/L; K_2HPO_4, 0.5 g/L; $NaNO_3$, 2.5 g/L; K_2SO_4, 1.0 g/L; NaCl, 1.0 g/L; $MgSO_4.7H_20$, 0.2 g/L; $CaCl_3$, 0.04 g/L; $FeSO_4.7H_20$, 0.01 g/L; EDTA, 0.08 g/L; H_3BO_3, 2.86 mg/L; $MnCl_2.4H_2O$, 220 mg/L; $CuSO_4$. $5H_2O$, 79 mg/L; MoO_3, 15 mg/L; and Na_2MoO_4, 21 mg/L and was supplied with light aeration (30 L/min) and the addition of 0.03% CO_2. At the end of the growth, the biomass was recovered and filtered through a 20 mm membrane, thoroughly washed with distilled water, frozen and lyophilized. Resultant SES contained 1% silicon, while regular spirulina contained less than 0.023% silicon (lower detection limit), as indicated by the manufacturer,

2.1.2. Animal husbandry/maintenance. Twenty-four male weanling Golden Syrian hamsters (Janvier-Labs, Le Genest-St-Isle, France) weighing ~ 90 g each were randomly divided into four groups of 6 animals (6 animals/plastic cage). They were housed at 23±1°C, subjected to a 12h light/dark cycle and handled in compliance with European Union rules and according to the guidelines of the NIH [20] and the Committee for Animal Care at the University of Montpellier (France) (permission number C 34 249).

2.1.3. Animal protocol design. Three groups were given a high-fat atherogenic diet (HF), consisting of 200 g/kg casein, 3 g/kg L-methionine, 393 g/kg corn starch, 154 g/kg sucrose,

50 g/kg cellulose, 100 g/kg hydrogenated coconut oil, 2 g/kg cholesterol, 35 g/kg mineral mix and 10 mg/kg vitamin mix, for 12 weeks. For reference, a fourth group received a standard diet (STD) consisting of 236 g/kg casein, 3.5 g/kg L-methionine, 300 g/kg corn starch, 30 g/kg maltodextrin 10, 290.5 g/kg sucrose, 50 g/kg cellulose, 45 g/kg vegetable oil, 35 g/kg mineral mix and 10 g/kg vitamin mix. In both diets, mineral and vitamin mixes were formulated according to AIN-93 guidelines [21]. The five groups had free access to both food and tap water which contained less than 0.023% silicon (lower detection limit),

The hamsters of each group received daily by gavage 1 mL of either tap water (STD and HF groups), or crude spirulina suspended in tap water at 57 mg/kg BW/day (HF-Sp group), or silicon-enriched spirulina (SES) suspended in tap water at 57 mg/kg BW/day (HF-SES group). Spirulina concentration was determined according to Reagan-Shaw et al. [22] and its silicon content (1%), and corresponded to a daily intake of 40 mg for a 70kg-human [23].

2.2. Analytical procedures

2.2.1. Plasma analysis. At the end of the experimental period, fasting blood samples were collected by cardiac puncture. Plasma was prepared by centrifugation at 2000 g for 10 min. Total cholesterol (TC) and HDL cholesterol (HDL-C) were determined in plasma (10 µL) using enzymatic kits (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) according to the manufacturer; HDL-C was measured after precipitation of very low- and low-density lipoprotein cholesterol using phosphotungstate reagent. Triglycerides (TG) and glucose levels were measured in plasma (10 µL), using a Randox enzymatic kit and reagents from the Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France) respectively.

Paraoxonase activity (PON) was determined using paraoxon as a substrate and measured by the increase in absorbance at 412 nm as previously described [24].

Insulinemia (10 µL plasma) was determined using ELISA kits (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) concentration was measured using specific Elisa kit according to the manufacturer (R&D Systems, Europe, Lille, France) and 100 µL plasma.

The homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was determined from fasting insulin and glucose values as previously described [25] and according to: HOMA-IR = [fasting glucose (mmol/L) x fasting insulin (mU/L)]/22.5

2.2.2. Liver anatomo-pathology. The liver was excised; some samples were removed for histology, while others were stored at -80°C until further use. For pathological analysis, liver

samples were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde and paraffin embedded, and 3 μm-thick serial sections prepared. Sections were deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin.

2.2.3. Liver antioxidant enzymes activity. Unfixed liver samples were homogenized (5%, w/v) in ice-cold 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4) and the homogenate was spun at 13,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was then stored at -80 °C for subsequent assay of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity using commercial kits (Randox Laboratories LTD, Crumlin, UK), and to quantify liver TNF-α and IL-6 levels using specific ELISA kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Europe, Lille, France).

2.2.4. Liver inflammation. To assay nuclear factor-κB (NF-κB) activity, liver tissue was homogenized (7.5% w/v) in a hypotonic buffer (pH 7.9) containing 20mM HEPES, 10mM EDTA, 10mM KCl, 1% protease inhibitor cocktail, 0.1% dithiothreitol, and 0.1% Igepal. Nuclear extracts were then obtained by homogenizing the pellet in lysis buffer (pH 7.9) containing 20mM HEPES, 1mM EDTA, 200mM NaCl, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol, and 1% protease inhibitor cocktail. NF-κB activity was determined from nuclear extracts using a commercial immunoassay kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) and according to manufacturer's instructions.

2.2.5. Liver and cardiac oxidative stress. Hepatic and cardiac superoxide anion ($O_2^{\circ -}$) production was evaluated by the intensity of lucigenin-enhanced chemiluminescence (10 μM lucigenin) as previously described [24]. Results were expressed as relative luminescence units (RLU) per mg of protein.

2.2.6. Vascular reactivity. The thoracic aorta was used to study *ex vivo* the responses to agonists or antagonists of arterial contraction. Immediately after removal, arterial tissue was immersed in phosphate saline buffer, pH 7.4 containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 0.5 KH_2PO_4, Na_2HPO_4, 2.5 $CaCl_2$, 10 HEPES and 10 glucose. Aortic tissue was cleaned of fat and connective tissue and cut into 2-3 mm-wide rings. Aortic rings were mounted in standard organ bath chambers (EMKA Technologies, Paris, France), maintained at 37°C and continuously bubbled with O_2, then changes in isometric tension were recorded as previously described [25]. Each arterial segment was subjected to a 60 min equilibration period at the predetermined optimal basal tension of 1 g. The contractile function of each segment was assessed with 1 μM phenylephrine (PE) and the presence of endothelium was confirmed by the vasorelaxation induced after application of acetylcholine (ACh, 1 μM). After several

wash-outs and a 20-30 minute period of stabilization, dose responses were performed by cumulative increases in the concentration of the agonist PE (0.01 to 10 μM range). Endothelial function was assessed by studying the relaxing effects of cumulative increases in the concentration of ACh (1 nM to 10 μM) in arteries contracted with a sub maximally active concentration of PE (10 μM). Endothelium-independent relaxations to sodium nitroprusside (SNP 1 nM to 100 μM) were studied in endothelium-denuded rings previously contracted with PE (10 μM). Each protocol was performed in triplicate in tissue from 6 different animals per group.

2.3. Statistical analysis

All data were expressed as mean ± SEM. One-way analysis of variance was followed by a multiple comparisons Student-Newman-Keuls *post hoc* test to compare differences among groups. Differences were considered statistically signicant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Food intake and body weight.

The HF-diet significantly increased the food intake by 27% ($p = 0.0062$) and the gain in body weight by ~80% ($p < 0.001$) of hamsters (HF group) compared with standard diet (STD group) (**Table 1**). Groups receiving the HF-diet plus spirulina enriched or not with silicon, i.e. HF-SES and HF-Sp groups, showed significantly less weight gain than the control HF group, i.e. 52% ($p = 0.0001$) and 44% ($p = 0.0008$) respectively, although there was no different food intake between these three groups (**Table 1**).

3.2. Plasma analysis.

Hamsters fed HF-diet showed a dyslipidemia compared with those of the STD group (**Table 1**). Except for LDL-C, supplementation with SES improved these parameters while spirulina did not.

In the HF group, and compared to the STD group, there was a 40% higher fasting plasma glucose level ($p = 0.0256$) and a 194% increase in insulinemia ($p < 0.0002$), leading to a 126% increase in insulin resistance as measured by HOMA-IR ($p = 0.0075$) (**Table 1**). Although in HF-SES glycæmia was elevated, plasma insulin level (72%, $p < 0.0001$) and HOMA-IR (56%, $p = 0.0010$) were identical to those of the STD group. These parameters were not different in the HF and the HF-Sp groups.

Plasma PON activity is summarized in **Table 1**. In the control HF group, its activity was

reduced by about 32% compared to the STD group ($p = 0.001$), which did not occur in groups HF-SES and HF-Sp.

In HF fed hamsters, MCP-1 plasma level was raised by 420% ($p < 0.0001$) compared to the STD group (**Table 1**). The level was lowered by 28% in HF-SES group ($p = 0.0380$) whereas HF-Sp showed a weaker effect when compared to HF group.

3.3. Liver and cardiac oxidative stress.

In the liver, $O_2^{\bullet -}$ production (i.e. NADPH oxidase activity) increased by 98% ($p < 0.0001$) in HF group when compared to STD group. This production was reduced in groups HF-SES and HF-Sp (64%; $p < 0.0001$ and 42%; $p < 0.0001$ respectively) when compared to the HF group (**Table 1**).

In the left cardiac ventricle, $O_2^{\bullet -}$ production grew up by 101% ($p < 0.0001$) in HF group compared to the STD group. It was reduced by 35% ($p = 0.0060$) and 20% ($p < 0.0001$) in hamsters receiving HF-SES and HF-Sp respectively compared to the HF group (**Table 1**).

3.4. Liver antioxidant enzymes activity.

In the HF group, the activities of liver superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) respectively raised by 35% ($p = 0.0171$) and 75% ($p < 0.0001$) in comparison to the STD group (**Table 1**). In HF-SES and HF-Sp groups, the SOD activity fell by 35% ($p = 0.0017$) and 55% ($p < 0.0001$) respectively and the activity of GPx dropped by 23% ($p = 0.01861$) and 24% ($p = 0.0049$) respectively (**Table 1**). In addition, in these two groups, the level of SOD activity corresponded to that measured in the STD group.

3.5. Liver steatosis and inflammation.

The hamsters fed the standard diet showed no histological evidence of hepatic steatosis (**Figure 1**). In contrast, the presence of severe intensity microvascular steatosis appeared in HF group, accompanied by a low inflammatory reaction as revealed by the presence of polymorphonuclear cells. No marked reduction in the degree of steatosis appeared in the liver of HF-SES and HF-Sp groups although some polymorphonuclear cells could be observed at a lesser extent.

The concentrations of TNF-α and Il-6 in the liver of HF group were significantly increased by 135% ($p < 0.0001$) and 64% ($p = 0.0015$) respectively compared to the STD group (**Table 1**). This low-grade inflammatory state was prevented only in HF-SES group, which showed

265 cytokine levels similar to those of the STD group.

In the HF group, NF-κB activity increased (36%, p = 0.0051) as compared to the STD group. In HF-SES group such an increase was prevented but not in Hf-Sp, and the hepatic NF-κB activity (21%, p = 0.0259) reached the level of the STD group (**Table 1**).

270 ***3.6. Vascular reactivity***.

Atherosclerosis induced functional alterations in the vasomotor properties of blood vessels affecting both vascular endothelium and smooth muscle. In our model, HF-diet induced such modifications in the vasomotor responses of hamster aorta. The contraction induced by PE was lower in HF group (2.57 ± 0.13 g) than in STD (3.16 ± 0.19 g) (**Figure 2A**)
275 corresponding to a 39% reduction in the contractile response (p = 0.0477). This reduction was not observed in the HF-SES group (3.38 ± 0.15 g) for which the response to PE was identical to that of STD group (p = 0.344 *vs* STD and p = 0.0005 *vs* HF). The vasorelaxant properties of arteries were also altered in HF group. Cumulative addition of Ach and SNP resulted in a concentration dependent relaxation of aorta previously contracted with PE (**Figure 2B and**
280 **2C**). HF group has reduced endothelium-dependent response to Ach as compared to STD group (Figure 7B). The maximal relaxation obtained for HF group was reduced by 23% when compared to Ach response in STD group (p = 0.0042). This reduction was observed in HF-Sp group (19%, p = 0.0334) but not in HF-SES group in which the relaxation to Ach was identical to that of STD group (p = 0.396). In the same way, SNP induced a dose-dependent
285 relaxation of rat aorta previously contracted with PE. In HF group the relaxing effect of SNP was lower than in the STD group, relaxation was reduced by 15% (p = 0.0218) as compared to STD group. In HF-SES, the relaxation to SNP was identical to that of STD group (p = 0.974), while in HF-Sp group, no difference was observed with HF group (p = 0.338). HF-diet induced vascular and endothelial dysfunctions which were completely prevented by SES
290 supplementation.

4. Discussion

Here, we investigated the effects of silicon-enriched spirulina (SES) on the disorders induced
295 by a HF-diet and associated with early atherosclerosis in hamsters. We showed that supplementation with SES prevents disorders including dyslipidemia, oxidative stress, inflammation, insulin resistance and vascular dysfunction. While some benefits on

dyslipidemia, oxidative stress and inflammation could be attributed to spirulina *per se* [26], the prevention of insulin resistance and vascular dysfunction more likely reflects an additional effect of silicon. Our results specifically corroborate the relevance of spirulina enrichment with silicon and highlight the efficacy of such food supplement in the prevention of cardiovascular risk factors.

As expected, the HF diet, characterized by the high level of saturated fatty acids and cholesterol, induced dyslipidemia with increased triglycerides, and both HDL and LDL cholesterol. This was partially prevented by spirulina enriched or not. HF-diet, promoting high plasma glucose and insulin, also induced IR as revealed by the HOMA-IR. Although supplementation with SES did not avoid the increase in glycaemia, IR was prevented due to the reduced insulinemia. The decrease in insulin sensitivity induced by the HF-diet is generally associated with other disturbances such as oxidative stress and low-grade inflammation, both contributing to the development of atherosclerosis [27]. In our model, HF-diet indeed induced cardiac and hepatic oxidative stress, as evidenced by $O_2^{\circ -}$ overproduction. The NADPH oxidase system is a major source of $O_2^{\circ -}$ production and any increase in its activity leads to an oxidative stress as shown before with increased activity and expression of $p22^{phox}$ NADPH oxidase subunit [28].

In the present study and as shown by Deng & Chow [19], both crude spirulina and SES improved oxidative status in the liver and the heart, by decreasing $O_2^{\circ -}$ production. Generally, radical oxygen species (ROS) overproduction is counteracted by induction of the antioxidant defense system to restore redox homeostasis, which includes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities indeed increased by HF-diets [29]. Here, in the HF group, hepatic SOD and GPx activities were enhanced. However, this induction did not prevent hepatic $O_2^{\circ -}$ overproduction, suggesting that ROS production could overwhelm enzymatic defense mechanisms, this imbalance resulting in liver oxidative stress. In hamsters fed with either crude spirulina or SES, GPx and SOD activities were lower than in HF animals. Therefore, in these groups, the decreases in hepatic and cardiac $O_2^{\circ -}$ production are not related to an increase in enzymatic antioxidant defenses but rather to a sparing effect due to their direct antioxidant properties [30]. This has been reported in other studies [24, 31] where dietary antioxidants (phenolics) consumption decreased endogenous antioxidant enzymes, scavenging oxygen radicals and reducing thereby the requirement for cellular antioxidant defense.

PON activity is another marker of oxidative stress. PON plays a major role in the antioxidant activity of HDL [32]. It is able to hydrolyze oxidized phospholipids and lipid peroxidation

products, thereby inhibiting LDL and HDL oxidation. Thus, PON could protect against atherosclerosis, and modulation of its activity is a part of current therapeutic targets [33]. HF-diets associated oxidative stress is known to decrease PON activity [34] and herein, this activity is strongly reduced in the HF group.

It is well known that IR associated to hepatic oxidative stress is related to the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), that is presented as an independent risk factor for atherosclerosis and CVD, although the mechanistic relationships are not fully understood [35]. We detected liver steatosis in the HF group, as reflected by lipid accumulation in the tissue. Despite the presence of polynuclear cells, no sign of fibrosis was detected in the liver, suggesting that the stage of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was not yet reached. The low-grade inflammation state is confirmed by cytokines levels (TNF-α and IL-6) that were raised as compared to STD hamsters. Supplementation with spirulina, enriched or not, provides no protection against liver steatosis even if the number of polynuclear cells was decreased. However, cytokines levels increases were prevented in SES group.

The theory proposed by Day & James [36] suggested that in NASH, an amplification loop exists between IR and oxidative stress and results in overproduction of inflammatory cytokines. In the present study, the prevention of IR and the attenuated $O_2^{\bullet -}$ production observed in HF-SES group related to a lower production of inflammatory cytokines could traduce a protection against NASH induced by HF-diet.

NF-κB, an oxidative stress-sensitive transcription factor, is a key regulator of expression of many genes involved in immune and inflammatory response, and NF-κB-induced cytokines widely contribute to the burden of inflammatory diseases, including atherosclerosis [37]. In our study, SES supplementation significantly prevented liver NF-κB activation induced by the HF-diet and the inherence of pro-inflammatory cytokines. The antioxidant effect of SES likely contributed to the inhibition of NF-κB activation.

Moreover, MCP-1 plays a critical role in the development of cardiovascular diseases. MCP-1, by its chemotactic activity, induces diapedesis of monocytes from the lumen to the sub endothelial space where they become foam cells, initiating fatty streak development that leads to atherosclerotic plaque formation [38]. Here, SES supplementation reduced the MCP-1 plasma level, suggesting that SES could limit the development of atherosclerosis. In addition to dyslipidemia, IR, oxidative stress and inflammation, HF-diet is known to induce vascular dysfunction [25,39]. Indeed, in our model, we observed genuine dysfunction characterized by altered responses to contractile agonist and antagonist, and to endothelium-dependent

vasorelaxant. SES supplementation efficiently prevented these alterations, these effects reflecting both avoidance of endothelial dysfunction and vascular remodeling known to be induced by the HF-diet [39]. No beneficial effect was observed when supplementation was performed with crude spirulina suggesting that the preventive effects of SES on vascular dysfunction could be attributable to silicon enrichment.

In a previous work, Maehira et col. [18] reported that after supply of soluble silica or coral sand *per os* in spontaneously hypertensive rats, blood pressure was reduced, and that this supply improved the related aortic gene expression. In our study, using a different model and silicon supplementation through SES, we have shown a prevention of vascular and endothelial functions assessed respectively by the contractile response to the agonist phenylephrine and the relaxation induced by acetylcholine. This could corroborate the results of Maehira et al. [18].

Otherwise, Loeper et al. [17] showed that rabbits given intravenously and / or orally silicon at different doses and chemical form than that used here, had reduced size of atherosclerotic plaques. Using a different model and a different supply mode makes difficult every comparison. However, our results strengthen those from Loeper et al. [17] and in addition, we have shown positive effects on insulin resistance, NAFLD, vascular reactivity and inflammation.

5. Conclusion

We demonstrated that, beside the intrinsic nutritional advantages of spirulina, silicon-rich spirulina supplementation had genuine benefits especially on insulin resistance and vascular function. The study revealed the efficiency of silicon in synergy with spirulina in a diet-induced hamster model of early atherosclerosis where SES prevented metabolic, oxidative, inflammatory disorders and vascular dysfunction. These properties open interesting perspectives in the context of silicon deficiency where intake is sufficient but bioavailability limited.

Conflict of interest statement

Joris Vidé was supported by a “CIFRE grant” (Convention Industrielle de Formation par la REcherche, no. 0084/2012) from Phyco-Biotech (Montpellier, France) and the French “Association Nationale de la Recherche et de la Technologie”.

Potential conflict of interest statement: Nicolas Jouy is Phyco-Biotech R&D.

Acknowledgements

The authors are grateful to Phyco-Biotech company for its interest in this work and its generous gift of the spirulina.

The contribution of each coauthor in the conception and design of the study is as follows: generation, collection, assembly, analysis and interpretation of data (Joris Vidé, Anne Virsolvy, Cindy Romain, Nicolas Jouy, Jeanne Ramos, Sylvie Gaillet, Jean-Max Rouanet); drafting and revision of the manuscript (Joris Vidé, Anne Virsolvy, Jean-Paul Cristol, Sylvain Richard, Sylvie Gaillet, Jean-Max Rouanet); approval of the final version of the manuscript (all authors).

References

[1] Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP. Nutritional value of the alga spirulina. World Rev Nutr Diet 1995; 77:32-46.

[2] Kay RA. Microalgae as food and supplement. Clin Rev Food Sci Nutr 1991; 30:555-573.

[3] Chamorro GA, Herrera G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V. Subchronic toxicity study in rats fed Spirulina. J Pharm Belg 1988; 43:29-36.

[4] Chen T., Wong YS, Zheng W. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched Spirulina platensis. Phytochemistry 2006; 67:2424-2430.

[5] Mazo VK, Gmoshinski IV, Zorin SN. New food sources of essential trace elements produced by biotechnology facilities. Biotechnol J 2007; 2:1297-1305.

[6] Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon: A nutritional beneficence for bones, brains and blood vessels? Nutr Today 1993; 28:13-18.

[7] Reffitt DM, Jugdaohsingh R, Thompson RP, Powell JJ. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. J Inorg Biochem 1999; 76:141-147.

[8] Jugdaohsingh R, Anderson SHC, Tucker KL, Elliott H, Kiel DP, Thompson RPH, Powell JJ. Dietary silicon intake and absorption. Am J Clin Nutr 2002; 75:887-893.

[9] Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Dissayabutr W, Anderson SHC, Thompson RPH, Powell JJ. The comparative absorption of silicon from different foods and food supplements. Br J Nutr 2009; 102:825-34.

[10] Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. J Am Diet Assoc 2001; 101:294-301.

[11] Pérez-Granados AM, Vaquero MP. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. J Nutr Health Aging 2002; 6:154-162.

[12] Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. J Nutr Health Aging 2007; 11:99-110.

[13] Calomme MR, Vanden Berghe DA. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. Biol Trace Elem Res 1997; 56:153-165.

[14] Carlisle EM. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. J Nutr 1976; 106:478-484.

[15] Loeper J, Goy-Loeper J, Rozensztajn L, Fragny M. The antiatheromatous action of silicon. Atherosclerosis 1979; 33:397-408.

[16] Schwarz K, Ricci BA, Punsar S, Karvonen MJ. Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in Finland. Lancet 1977; 1:538-539.

[17] Loeper J, Goy J, Fragny M, Troniou R, Bedu O. Study of fatty acids in atheroma induced in rabbits by an atherogenic diet with or without silicon I.V. treatment. Life Sci 1988; 42: 2105-2112.

[18] Maehira F, Motomura K, Ishimine N, Miyagi I, Eguchi Y, Teruya S. Soluble silica and coral sand suppress high blood pressure and improve the related aortic gene expressions in spontaneously hypertensive rats. Nutr Res 2011; 31:147-156.

[19] Deng R, Chow T-J. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. Cardiovasc Ther 2010; 28:e33-45.

[20] National Research Council. Guide for the care and the use of laboratory animals; National Institutes of Health Publication no.85-123 (rev.); U.S. Government Printing Office, Washington, DC 1985.

[21] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. J Nutr 1993; 123:1939-1951.

[22] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 2007; 22: 659-661.

[23] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Silicon. EFSA J 2004; 60:1-11.

[24] Romain C, Bresciani L, Gaillet S, Feillet-Coudray C, Calani L, Bonafos B, et al. Moderate chronic administration of Vineatrol-enriched red wines improves metabolic, oxidative, and inflammatory markers in hamsters fed a high-fat diet. Mol Nutr Food Res 2014; 58:1212-1225.

[25] Suh JH, Virsolvy A, Goux A, Cassan C, Richard S, Cristol JP, et al. Polyphenols prevent lipid abnormalities and arterial dysfunction in hamsters on a high-fat diet: a comparative study or red grape and white persimmon wines. Food Funct 2011; 2:555-561.

[26] Belay A. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. J Am Nutraceut Assoc 2002; 5:27-48.

[27] Romain C, Gaillet S, Carillon J, Vidé J, Ramos J, Izard J-C, et al. Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. J Agric Food Chem 2012; 60:11029-11036.

[28] Décordé K, Ventura E, Lacan D, Ramos J, Cristol J-P, Rouanet J-M. An SOD rich melon extract Extramel prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2010; 20:301-307.

[29] Agbor GA, Akinfiresoye L, Sortino J, Johnson R, Vinson JA. Piper species protect cardiac, hepatic and renal antioxidant status of atherogenic diet fed hamsters. Food Chem 2012; 134:1354-1359.

[30] Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. Nutrition 2011; 27:582-589.

[31] Pedret A, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Catalán Ú, Romeu M, Giralt M, et al. Polyphenol-rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. Mol Nutr Food Res 2012; 56:1025-1033.

[32] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:473-480.

[33] She Z-G, Chen H-Z, Yan Y, Li H, Liu D-P. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. Antioxid Redox Signal 2012; 16:597-632.

[34] Thomàs-Moyà E, Gianotti M. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. Mol Med 2007; 13:203-209.

[35] Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? Eur Heart J 2012; 33:1190-1200.

[36] Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "'Hits'"? Gastroenterology 1998; 114:842-845.

[37] Pamukcu B, Lip GYH, Shantsila E. The nuclear factor-kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. Thromb Res 2011; 128:117-123.

[38] Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. Cytokine 2012; 60:1-12.

[39] Damjanovic M, Barton M. Fat intake and cardiovascular response. Curr Hypertens Rep 2008; 10:25-31.

Figure captions

Figure 1. Histological evaluation of hepatic steatosis in STD, (A), HF (B), HF-SES (C) and HF-Sp (D) groups. Images illustrated representative liver sections (40x magnification) and showed moderate to severe hepatic steatosis in HF animals (B) with microvascular steatosis (MS), sinusoidal capillaries (S) and inflammation indicated by the widespread presence of polynuclear cells (PN), compared to STD animals (A). Hepatic steatosis is not prevented by Sp (C) and SES (D) supplementations, although polynuclear cells number is lowered. Sinusoidal capillary (S); hepatocyte (H); nucleus (N); microvascular steatosis (MS); polynuclear cells (PN).

Figure 2. Vascular reactivity of hamster aorta in STD, HF, HF-SES and HF-Sp groups. (A) Contractility was evaluated in response to cumulative concentrations of PE. Endothelium dependent relaxation in response to cumulative doses of Ach (B) and smooth muscle dependent relaxation in response to SNP (C) were studied on arteries previously contracted with PE (10 μM). Left panels: dose-response curves. Right panels: maximal contraction or relaxation obtained for each group in various conditions. Values are means ± SEM (n=6).

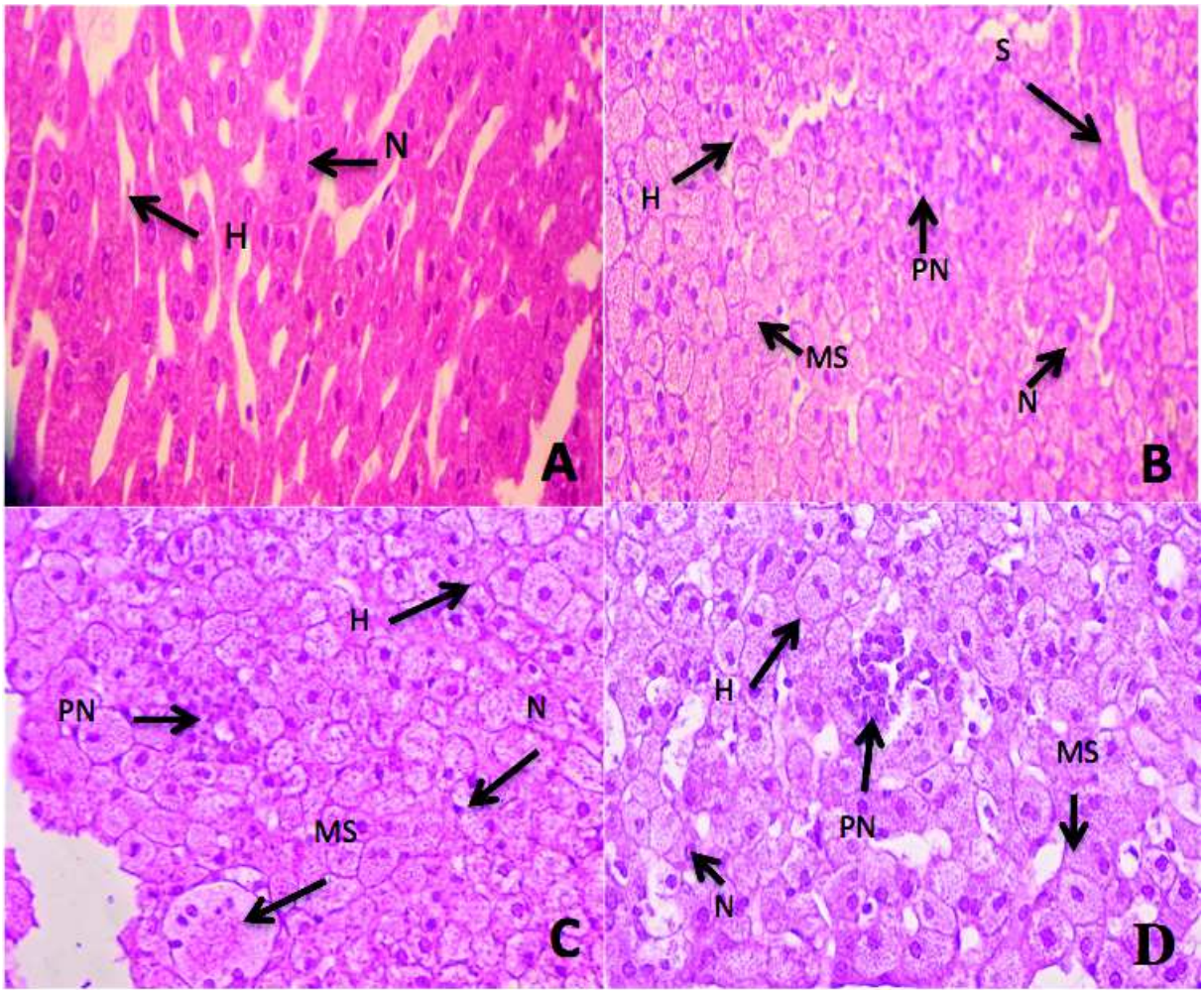
565 **Table 1**. Nutritional, plasma and liver biochemical parameters in the different groups[1].

	STD	HF	HF-SES	HF-Sp
Body Weight gain (g)	32.7±5.2[a]	58.7±7.2[b]	28.6±4.3[a]	33.0±2.8[a]
Food intake (g/day)	4.9±0.2[a]	6.2±0.6[b]	5.5±0.6[b]	5.5±0.5[b]
Plasma				
TC (mmol/L)	3.19±0.15[a]	7.26±0.26[b]	6.11±0.37[c]	6.81±0.23[b]
HDL-C (mmol/L)	1.97±0.23[a]	3.26±0.18[b]	2.52±0.16[c]	3.03±0.12[b]
LDL-C (mmol/L)	1.22±0.23[a]	4.00±0.32[b]	3.59±0.37[b]	3.78±0.24[b]
TG (mmol/L)	1.06±0.06[a]	1.73±0.27[b]	1.14±0.03[a]	1.60±0.29[ab]
PON (U/mL)	172.8±10.2[a]	118.2±11.6[b]	146.9±9.9[ab]	151.0±7.7[a]
Glucose (mmol/L)	7.78±0.13[a]	10.88±0.67[b]	12.28±0.91[b]	12.04±1.46[b]
Insulin (pmol/L)	155.4±43.1[a]	456.7±79.8[b]	127.8±43.9[a]	178.0±30.5[a]
HOMA-IR	9.98±2.90[a]	22.55±4.90[b]	9.92±0.80[a]	12.06±2.53[c]
MCP-1 (pg/mL)[2]	30.5±11.5[a]	159.5±19.4[b]	114.2±7.7[c]	133.0±22.4[bc]
Liver				
Inflammation				
TNF-α (pg/mg protein)	52.1±7.9[a]	122.8±14.6[b]	63.0±7.7[a]	102.9±19.2[b]
IL-6 (pg/mg protein)	220.7±14.7[a]	362.6±22.2[b]	254.3±31.2[a]	344.5±30.2[b]
NF-κB (ng/g liver)	6.2±0.5[a]	8.5±0.5[b]	6.7±0.4[ac]	8.2±0.4[bc]
Oxidative status				
$O_2^{\bullet -}$ (RLU/mg protein)[3]	55.36±3.95[ac]	109.60±5.74[b]	39.94±5.31[a]	63.04±4.27[c]
Cardiac oxidative status				
$O_2^{\bullet -}$ (RLU/mg protein)[3]	61.98±4.16[a]	124.18±9.58[b]	81.25±5.94[c]	99.33±5.10[d]
Antioxidant enzyme activity				
SOD (U/mg protein)	39.8±4.1[a]	52.8±3.2[b]	34.3±6.3[a]	23.5±0.4[a]
GPx (U/mg protein x 10^{-2})	79.1±5.6[a]	138.6±9.8[b]	107.5±5.8[c]	102.6±9.1[ac]

[1] *Values are means ± SEM (n = 6). For each dietary treatment, means in a row with different letters differ, $p < 0.05$. Plasma total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), PON (Paraoxonase activity) and HOMA-IR (Insulin resistance status) were*
570 *measured after overnight fasting, at the end of the 12-week treatment period.*
[2] *Plasma monocyte chemo-attractant protein-1 levels.*
[3] *$O_2^{\bullet -}$ production, i.e. NADPH oxidase activity, expressed as relative luminescence units.*

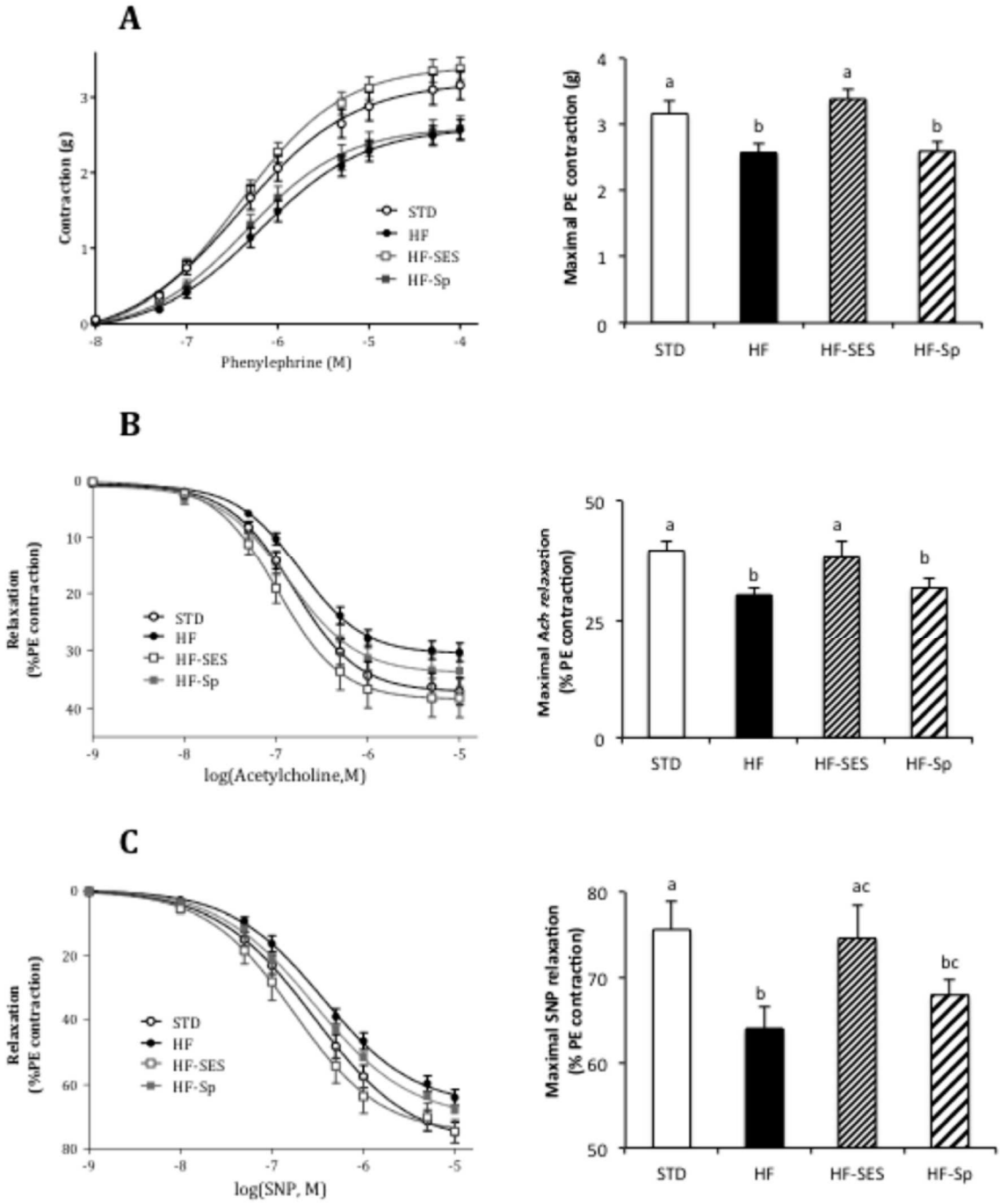
575

Figure 1



600

Figure 2


A
Contraction (g)
Phenylephrine (M)
STD
HF
HF-SES
HF-Sp
Maximal PE contraction (g)
B
Relaxation (%PE contraction)
log(Acetylcholine,M)
Maximal Ach relaxation (% PE contraction)
C
Relaxation (%PE contraction)
log(SNP, M)
Maximal SNP relaxation (% PE contraction)

C.3 Conclusion de l'étude 2

Afin de faciliter l'analyse des résultats, l'article publié ne fait pas mention des groupes ayant reçu le régime standard et supplémenté en spiruline enrichie en silicium (STD-SES) et en spiruline brute (STD-Sp).
Le régime athéromateux induit bien une dyslipidémie. Celle-ci est partiellement corrigée par les deux types de spirulines mais avec un meilleur effet de la spiruline enrichie en silicium. La résistance à l'insuline (HOMA-IR) induite par le régime athéromateux est atténuée seulement par la spiruline enrichie en silicium. Cette résistance à l'insuline est généralement associée avec d'autres perturbations comme le stress oxydant et l'inflammation de bas niveau, contribuant tous les deux au développement de l'athérosclérose. Le stress oxydant est atténué de manière significative par la spiruline enrichie en silicium. Le régime athéromateux induit une stéatose hépatique, liée également à un phénomène d'inflammation de bas niveau. Bien qu'elle ne prévienne pas le développement de la stéatose, la spiruline enrichie en silicium ramène la concentration en TNF-α, IL-6 et NF-κB à un niveau basal. La boucle d'amplification existant entre le stress oxydant et l'inflammation dans la pathologie athéromateuse est atténuée par la spiruline enrichie en silicium, ceci lui conférant un effet protecteur dans l'athérogenèse. Ceci est également confirmé par le fait que seule la spiruline enrichie en silicium permet de rétablir les propriétés contractiles de l'artère, qui ont été altérées par le régime athéromateux.

L'étude a révélé l'efficacité du silicium en synergie avec la spiruline dans un modèle nutritionnel d'hamster athéromateux.
Ces propriétés ouvrent des perspectives intéressantes dans le contexte de la carence en silicium, où l'apport est suffisant mais la biodisponibilité est faible.
Il reste à explorer les mécanismes d'action mis en jeu.

D Brevet d'application

Les résultats obtenus durant ces deux études, et plus particulièrement au cours de l'**étude 2**, ont débouché sur le dépôt d'un brevet d'application déposé par l'entreprise Phyco-Biotech.

Dépôt d'un brevet d'application de la spiruline enrichie en silicium, INPI (Institut National de la propriété industrielle), Septembre 2014.

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

BREVET D'INVENTION

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

15 rue des Minimes - CS 50001 - 92677 Courbevoie Cedex

Pour vous informer : INPI Direct 0820 210 211

Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 56 65 86 00

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

REMISE DES PIÈCES DATE N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	**1NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE** Regimbeau 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FR
Vos références pour ce dossier 248012/D33755	

2 NATURE DE LA DEMANDE	
Nature	Brevet d'invention
3 TITRE DE L'INVENTION	
Titre	COMPOSITION COMPRENANT UNE MICROALGUE ENRICHIE EN SILICIUM POUR UNE UTILISATION THERAPEUTIQUE
4 PRIORITÉ	
5-1 DEMANDEUR	**Personne morale**
Nom	PHYCO- BIOTECH
Affaire suivie par	
Rue	188 rue Maurice Béjart
Code postal et ville	34080 MONTPELLIER
Pays	FR
Nationalité	FR
Forme juridique	Société par actions simplifiées (SAS)
N° SIREN	530 261 577
Code APE-NAF	
N° de téléphone	
N° de télécopie	
Courrier électronique	
5-2 DEMANDEUR	**Personne morale**
Nom	UNIVERSITE MONTPELLIER II
Affaire suivie par	

Rue	Place Eugène Bataillon
Code postal et ville	34090 MONTPELLIER
Pays	FR
Nationalité	FR
Forme juridique	
N° SIREN	193 410 883
Code APE-NAF	
N° de téléphone	
N° de télécopie	
Courrier électronique	
5-3 DEMANDEUR	**Personne morale**
Nom	UNIVERSITE DE MONTPELLIER I
Affaire suivie par	
Rue	5, boulevard Henri IV
Code postal et ville	34000 MONTPELLIER
Pays	FR
Nationalité	FR
Forme juridique	
N° SIREN	193 410 875
Code APE-NAF	
N° de téléphone	
N° de télécopie	
Courrier électronique	
6 MANDATAIRE	
Nom	Regimbeau
Qualité	Cabinet CPI : Cécile FROMEN, pas de pouvoir
Rue	20, rue de Chazelles
Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
Pays	FR
N° de téléphone	+33 1 44 29 35 00
N° de télécopie	+33 1 44 29 35 99
Courrier électronique	info@regimbeau.eu
7 RAPPORT DE RECHERCHE	
Type d'établissement	Établissement immédiat

Type d'envoi	Envoi papier			
8 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES				
9 DÉPÔT DE MATIÈRE BIOLOGIQUE				
10 SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS				
11 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS	**Fichier électronique**		**Détails**	
Fichier corps du texte	textebrevet.pdf		page(s) 30, D 27, R 2, AB 1	
Drawings	dessins.pdf			
12 EXTENSION DE LA PROTECTION				
En cochant la case ci-après, le(s) demandeur(s) manifestent l'intention d'étendre les effets de la demande de brevet et du brevet délivré sur la base de cette demande au territoire indiqué avec lequel des accords d'extension sont en vigueur à la date du dépôt de la demande.				
■ **Polynésie française**				
13 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement	Prélèvement du compte client			
Numéro du compte	67			
14 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
031 Redevance d'extension pour la Polynésie Française	EURO	300	1	300
062 Dépôt d'une demande électronique	EURO	26	1	26
063 Rapport de recherche	EURO	500	1	500
Total	EURO			826
15 ANNOTATION				
16 DATE ET SIGNATURE				
Signé numériquement par	Subject: FR, CABINET REGIMBEAU, Michel PERNELLE; Issuer: FR, INPI, INPI-EN-LIGNE 1.1			
Date	11 September 2014			
Signataire	Mandataire			

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.

8. Inventeurs

8.1. Liste des inventeurs

Nom / Prénom	Code d'unité	Employeur	Fonction exercée (exemples : MCF, PR, doctorant)	Taux de répartition (Contribution à l'invention)	Signatures
BACCOU Jean-Claude	PhycoB	Phycobiotech	Conseil Scientifique	11%	
CRISTOL Jean-Paul	UMR 204	UM1	PR	11%	
GAILLET Sylvie	UMR 204	UM2	MCF	11%	
GAY Gilbert	PhycoB.	Phycobiotech	Président	12%	
JOUY Nicolas	PhycoB.	Phycobiotech	R & D	11%	
RICHARD Sylvain	INSERM U1046	UM1	DR	11%	
ROUANET Jean-Max	UMR 204	UM2	MCF	11%.	
VIDÉ Joris	UMR 204 PhycoB	Phycobiotech	Doctorant	11%	
VIRSOLVY Anne	INSERM U1046	UM1	CR	11%	
……..	……	……	……	……	
……..	……	……	……	……	

COMPOSITION COMPRENANT UNE MICROALGUE ENRICHIE EN SILICIUM POUR UNE UTILISATION THERAPEUTIQUE

La présente invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique. L'invention a également pour objet l'utilisation d'une telle composition pour la prévention ou le traitement d'une pathologie choisie parmi le diabète, l'obésité, les dyslipidémies, les pathologies cardiovasculaires, l'athérosclérose et l'inflammation.

Il est admis aujourd'hui que l'augmentation de la fréquence de surcharge pondérale et de l'obésité, du diabète de type 2 et/ou des maladies cardiovasculaires chez de nombreuses personnes dans les pays développés est due à un apport excessif en calories et en corps gras. Ces pathologies sont liées à une déficience métabolique, ou syndrome métabolique, qui affecte près de 50 millions d'américains (presque un américain adulte sur 4) et environ 30 millions d'européens. Environ 7% des adultes entre 20 et 30 ans et 40% des adultes de plus de 40 ans présentent les critères de ce syndrome métabolique. Le fait de présenter un ou plusieurs des facteurs liés au syndrome métabolique- augmentation de la tension artérielle, taux élevé d'insuline, excès de graisse autour de la taille ou taux anormal de cholestérol - favorise le risque de pathologies graves, notamment l'athérosclérose.

Les compositions actuellement connues utilisées pour traiter ou prévenir ces pathologies et/ou pour limiter un ou plusieurs facteurs de risque sont notamment insuffisamment efficaces et trop chères. Par ailleurs, les régimes hypocaloriques peuvent avoir un succès limité pour l'amélioration de la surcharge pondérale et de l'obésité, et notamment un effet limité dans le temps.

Il existe donc un besoin de nouvelles compositions pour le traitement ou la prévention de pathologies liées au syndrome métabolique.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidenceque l'administration à des sujets d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau entraîne la réduction, ou le retour à un niveau standard, de certains paramètres modifiés dans le cas de l'absorption d'un régime riche en lipides. Ces résultats ont été obtenus dans un modèle animal reconnu de l'athérosclérose et des dyslipidémies (Vinson *et al*., 2001 ; Wang *et al*., 2001). En effet, plusieurs paramètres caractérisant les lipides sanguins, le stress oxydatif et l'inflammation, mesurés chez un animal soumis à un régime hypercalorique et recevant une composition selon l'invention, ont un niveau similaire à celui d'un animal

CONFIDENTIEL

témoin soumis à un régime alimentaire standard et ne recevant pas une composition selon l'invention.

Les avantages d'une composition selon l'invention sont :

- La facilité, le faible coût et la reproductibilité de production,
- La stabilité dans le temps,
- La qualité de niveau de qualité alimentaire,
- Un fort effet biologique,
- La possibilité d'une administration par voie orale.

On connaît l'importance du rôle du silicium dans la formation des os en améliorant l'absorption du calcium, la formation du collagène, composant essentiel de l'architecture de la peau et des tissus conjonctifs notamment de la paroi des artères et des cartilages et le bon état des ongles. Le silicium se situe principalement dans le tissu conjonctif, dans les macromolécules comme les glycosaminoglycanes, le collagène et l'élastine (Seaborne C.D. *et al.*, 1993). Des taux élevés de silicium liés sont présents dans la paroi artérielle, en particulier dans l'intima. Sur des ostéoblastes en culture *in-vitro*, l'acide orthosilicique stimule la synthèse de collagène de type 1 et la différenciation des ostéoblastes (Reffitt *et al*., 2003).

La présence de silicium dans le tissu aortique réduit la pression artérielle chez le rat spontanément hypertendu et supprime l'expression des gènes de l'angiogénèse dans la paroi aortique et des facteurs de croissance liés au remodelage vasculaire (Maehira *et al.*, 2011). Un effet anti-athéromateux de silicium administré par voie intraveineuse ou *per os* a été montré chez le lapin (Loeper *et al*., 1979). Dans cette publication, les auteurs utilisent du silicate de sodium, du silicate de lysine et du monométhyltrisilanol administrés quotidiennement durant l'étude soit par voie intraveineuse soit *per os*. Ces formes de silicium ne correspondent pas à celles présentes dans la composition comprenant une microalgue enrichie en silicium. De plus il est inenvisageable d'administrer ces formes de silicium en intraveineux chez l'homme. Or c'est sous cette forme d'administration que des résultats positifs ont été observés sur le nombre de plaques d'athéromes présentes sur les aortes des lapins traités. Cependant, même sur ces lapins recevant ces formes de silicium par voie intraveineuse, les auteurs observent une variation non significative des lipides plasmatiques des animaux ayant reçu du silicium. L'utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium pour améliorer les caractéristiques de lipides sanguins, le stress oxydatif et/ou l'inflammation créés par l'absorption d'un régime hypercalorique ne sont pas décrits.

CONFIDENTIEL

L'invention sera maintenant décrite de manière détaillée et à l'aide d'exemples, destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

La présente invention a pour premier objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée comme médicament pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique.

Le terme « microalgue » désigne une algue microscopique photosynthétique, ladite microalgue peut être une microalgue eucaryote ou procaryote.

Le terme «microalgue enrichie en silicium » désigne une microalgue associée à du silicium présent en quantité supérieure par rapport à la quantité de silicium habituellement mesurée en association avec ladite microalgue lorsqu'elle est cultivée dans des conditions standard ou qu'elle est isolée de son milieu naturel.

Une composition selon l'invention comprend une microalgue enrichie en silicium dans laquelle le silicium peut être détecté dans le compartiment intracellulaire et/ou associé aux membranes et/ou associé à la surface de ladite microalgue. Le silicium peut être détecté par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment par l'observation microscopique, et de préférence par microscopie électronique couplée à une microsonde à rayons X. Lors de l'observation par microscopie électronique couplée à une microsonde à rayons X, des grains de silicium particulièrement denses peuvent être observés.

Le terme « silicium sous une forme soluble dans l'eau », ou éventuellement « silicium soluble dans l'eau », désigne du silicium présent et détectable dans un extrait aqueux d'une composition selon l'invention. Selon un aspect particulier de l'invention, ledit silicium sous une forme soluble dans l'eau est présent dans un extrait aqueux d'une composition selon l'invention comprenant une microalgue enrichie en silicium. La détection de la présence de silicium associé à une microalgue dans une composition selon l'invention peut être réalisée également par tout moyen chimique ou biochimique connu de l'homme du métier.

Le terme «silicium sous une forme soluble dans l'eau» ou « silicium sous une forme soluble » ou « silicium solubilisable » désigne du silicium disponible sous une forme réduite et pouvant être assimilé par l'organisme, contrairement au silicium minéral, qui est sous une forme oxydée, telle que la silice, qui peut précipiter et n'est pas assimilable par l'organisme. Dans une composition selon l'invention, le silicium présent sous une forme soluble dans l'eau peut se présenter sous une forme simple ou sous une forme complexée à une molécule organique.

Le terme « pathologie liée au syndrome métabolique » désigne l'une des pathologies pouvant être observée et participer au syndrome métabolique. Le syndrome métabolique

CONFIDENTIEL

représente un ensemble de facteurs qui augmentent le risque de maladies cardio-vasculaires, d'attaques cérébrales et de diabète de type 2. Le terme « syndrome métabolique » peut désigner aussi le syndrome cardiométabolique ou le prédiabète. La prévention d'une pathologie liée au syndrome métabolique désigne également l'amélioration du bien-être d'un consommateur dont l'alimentation est riche en calories et/ou en corps gras, et qui de ce fait présente un risque de stress oxydant et/ou de maladie cardiovasculaire.

Dans un rapport de 2004 intitulé « *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks* », l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a évalué l'impact de 24 facteurs de risques sur la mortalité à l'échelle mondiale, en compilant des données scientifiques et sanitaires provenant de tous les pays, industrialisés ou non. Parmi les facteurs de risque principaux, l'OMS indique que les facteurs « hypertension », « un taux de glycémie élevée », « inactivité physique », « surpoids et obésité » et un taux élevé de cholestérol » totalisent 33,4% des décès au niveau planétaire, tous pays confondus. Or ces facteurs de risque correspondent au syndrome métabolique.

Selon un aspect particulier, une composition selon l'invention comprend une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, ladite microalgue étant choisie parmi les microalgues eucaryotes. Selon un aspect plus particulier de l'invention, ladite microalgue eucaryote est choisie dans le groupe constitué par : les Chlorophycées (et de préférence *Dunaliella, Chlorella ou Parietochloris incisa)*, les Chrysophycées, les Coccolithophyceae, les Diatomées, les Euglénophycées, les Rhodophycées et les Trebouxiophyceae.

Selon un autre aspect particulier, une composition selon l'invention comprend une microalgue ennrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, ladite microalgue étant choisie parmi les microalgues procaryotes, aussi désignées par le terme « cyanobactéries » ou « algues bleues ». Selon un aspect plus particulier de l'invention, ladite microalgue procaryote est choisie dans le groupe constitué par les cyanophycées, parmi lesquelles la spiruline est particulièrement préférée.

Selon un aspect particulier, l'invention a donc pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, ladite microalgue étant la spiruline, pour son utilisation pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique.

Le terme « spiruline » désigne une algue filamenteuse bleue-verte appartenant au phyllum Cyanophyta, de la classe des Cyanophyceae, de l'ordre Nostocales,

CONFIDENTIEL

famille Oscillatoriaceae, et du genre Spirulina ou Arthrospira, et de préférence *Arthrospira platensis* ou *Arthrospira maxima*.

Les spirulines sont des microalgues très riches en protéines, de l'ordre de 70% de protéines par rapport à la matière sèche, qui sont un complément nutritionnel reconnu pour son efficacité et autorisées en alimentation humaine. Les spirulines sont souvent cultivées dans des bassins, ou éventuellement dans des réacteurs tubulaires, et ceci permet de contrôler les conditions de culture donc d'obtenir des résultats reproductibles quant à la composition de la matière végétale obtenue, par comparaison avec des cultures de végétaux réalisées en plein champ ou même sous serre.

Selon un aspect plus particulier, la présente invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, ladite microalgue étant choisie parmi *Arthrospira platensis* et *Arthrospira maxima*.

Selon un aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée comme médicament, comme composition pharmaceutique, comme agent cosmétique, comme composition alimentaire, comme nutraceutique ou comme complément alimentaire, pour pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique. Une composition selon l'invention peut comprendre une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, et optionnellement tout véhicule ou excipient approprié, acceptable du point de vue pharmaceutique, cosmétique, alimentaire ou nutraceutique, ainsi que des additifs conventionnels, connus de l'homme du métier.

Selon un aspect particulier, une composition selon l'invention est formulée pour être administrée par voie orale. Selon un autre aspect particulier, une composition selon l'invention se présente sous la forme de gélule, capsule, comprimé, granule, tablette, poudre ou solution buvable.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée comme médicament pour son utilisation pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, ladite pathologie étant notamment choisie parmi :

- Le diabète de type 2,
- L'obésité nutritionnelle,
- Les dyslipidémies,
- Les pathologies cardiovasculaires,

CONFIDENTIEL

- L'athérosclérose, et
- L'inflammation.

Le diabète de type 2 se caractérise par une hyperglycémie chronique. Selon un aspect particulier, une composition selon l'invention est utilisée comme médicament pour prévenir ou traiter une dysrégulation de la sécrétion de l'insuline et/ou pour la prévention ou le traitement de l'insulino-résistance.

L'obésité correspond à un excès de masse grasse.

Le terme « dyslipidémie » désigne un taux anormal de lipides dans le sang. Ce terme inclut notamment les hyperlipidémies, c'est à dire une élévation du taux de lipides sanguins observée lors d'une alimentation riche en graisses. Parmi les hyperlipidémies, on peut citer :

- Une élévation du taux de lipoprotéines choisies parmi les chylomicrons, les IDL (intermediate density lipoprotein), les HDL (high density lipoproteins), les LDL (low density lipoproteins).
- Une élévation du taux de cholestérol total,
- Une élévation du taux de triglycérides et
- Une combinaison de deux ou plus de ces paramètres.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée comme médicament pour la prévention ou le traitement d'une pathologie cardiovasculaire. Le terme « pathologie cardiovasculaire » désigne une pathologie affectant le système le cœur et la circulation sanguine d'un sujet, et notamment les maladies coronariennes, les maladies du muscle cardiaque, des valves cardiaques ou du péricarde, les maladies du rythme ou de la conduction cardiaque, les maladies des vaisseaux, les pathologies artérielles (hypertension et hypotension artérielle), les troubles de la fonction contractile artérielle, l'athérome et l'athérosclérose. En effet, les inventeurs ont montré que l'administration à un sujet d'une composition selon l'invention permet d'observer un effet vasculoprotecteur.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une inflammation, et/ou d'une inflammation de bas niveau.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou la diminution de la surcharge pondérale, pour la prévention ou la diminution de l'adipogenèse, ou en tant qu'agent anti-oxydant.

CONFIDENTIEL

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée comme médicament pour la prévention ou le traitement d'une pathologie associée à, ou consécutive à, un stress oxydant. Le « stress oxydant » est notamment caractérisé par un état comprenant la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, par exemple les anions superoxyde.

Selon un autre aspect, une composition selon l'invention comprend une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, dans laquelle la proportion de silicium total dans ladite composition, par rapport à la masse sèche de microalgue présente dans ladite composition, est comprise entre 0,05% et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10%, et de préférence entre 0,1% et 5%, de préférence entre 0,5% et 5%, de préférence entre 0,9% et 4% et plus préférentiellement entre 0,9% et 1,5%.

Le terme « silicium total» désigne la quantité totale du silicium détectée dans une composition selon l'invention. Selon un aspect particulier de l'invention, le terme « silicium total» désigne la quantité totale du silicium détectée dans la masse sèche de microalgue comprise dans une composition destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention. La quantité totale de silicium peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme de l'art après minéralisation totale de l'échantillon de composition selon l'invention, notamment par dosage gravimétrique, par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) ou par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrum).

Le terme «masse sèche de microalgue » désigne la masse de microalgue présente dans la composition, déterminée après déshydratation de la microalgue, la déshydratation, ou le séchage, de ladite microalgue pouvant être réalisée par tout protocole choisi parmi les protocoles connus par l'homme de l'art. Le terme de « masse sèche de microalgue » peut être considéré comme équivalent au terme biomasse.

Selon un aspect particulier, une composition selon l'invention comprend une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, dans laquelle la proportion de silicium sous une forme soluble dans l'eau dans ladite composition, par rapport à quantité de silicium total présent dans la composition, est comprise entre 5% et 90%, de préférence entre 10% et 80%, de préférence entre 20% et 70%, de préférence entre 30% et 60%, de préférence entre 40% et 60% du silicium total présent dans ladite composition.

CONFIDENTIEL

Dans ladite composition selon l'invention, la proportion de silicium sous une forme soluble dans l'eau peut être déterminée par tout moyen connu de l'homme du métier, et notamment par l'extraction de ladite composition selon l'invention par une solution aqueuse. De préférence, la proportion de silicium sous une forme soluble dans l'eau dans une composition selon l'invention peut être déterminée par extraction séquentielle de la composition par des solutions aqueuses d'agents actifs d'une composition selon l'invention. Si le silicium est présent sous une forme soluble dans l'eau, il sera solubilisé partiellement ou totalement au cours des extractions successives. Si le silicium est présent sous une forme polymérisée, il restera sous une forme insoluble malgré les extractions successives. L'extraction peut notamment être réalisée par : de l'eau, une solution enzymatique capable de dégrader les parois cellulaires végétales, une solution de détergent capable de solubiliser les fractions lipophiles, ou une solution enzymatique capable de digérer les protéines. La quantité de silicium présente dans un extrait aqueux, ou dans tout extrait d'une composition destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme de l'art, notamment par dosage gravimétrique, par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) ou par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrum).

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, ladite composition étant obtenue par la mise en œuvre d'un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la mise en culture de ladite microalgue dans des conditions et un milieu de culture adaptés jusqu'à l'obtention d'une culture de microalgue caractérisée par une biomasse sèche comprise entre 0,1 et 2 g/litre de culture,

b) la préparation d'une solution aqueuse de silicium, par l'ajout de silicium sous la forme d'une solution ou d'une poudre, suivie de l'agitation de la solution aqueuse jusqu'à dissolution complète du silicium,

c) l'addition de la solution préparée en b) à la culture de microalgue obtenue en a),d) la mise en culture de ladite microalgue sous agitation pendant une durée d'au moins 12 heures,

e) la récolte d'au moins une partie de la culture de microalgue.

Selon un aspect plus particulier, l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, ladite composition étant obtenue par

CONFIDENTIEL

la mise en œuvre d'un procédé comprenant la mise en culture de ladite microalgue dans des conditions et un milieu de culture adaptés jusqu'à l'obtention d'une culture de microalgue caractérisée par une biomasse sèche comprise entre 0,1 et 2 g/litre de culture, suivie de la préparation d'une solution aqueuse de silicium et de polyphénols, par l'addition de polyphénols à une solution aqueuse de silicium ou par l'addition de silicium à une solution aqueuse de polyphénols, suivie d'un mélange par agitation.

Dans un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, la culture de microalgues est réalisée dans des conditions adaptées à la culture des microalgues et connues de l'homme du métier. La culture des microalgues est réalisée dans des conditions permettant d'éviter les contaminations atmosphériques, notamment sous serre et dans un bassin permettant une pénétration optimale de la lumière, et donc l'activité photosynthétique, par exemple dans des bassins de 25 M^3 et d'une faible profondeur, entre 15 et 25 cm, et de préférence 20 +/- 3 cm. En effet, le risque de récolter la spiruline croissant naturellement dans des lacs est de voir proliférer certaines cyanobactéries toxiques dans ces conditions non contrôlées.

Le mode de culture le plus répandu et le moins coûteux pour la spiruline est le bassin de type « raceway » dont l'agitation est assurée par une roue à aubes et avec une cloison centrale permettant de faire circuler la culture en circuit fermé. Ce mode de production permet d'isoler la culture dans des bassins de faible profondeur où les apports minéraux du milieu de culture artificiel sont contrôlés.

La culture est possible en cuve de 1 M^3 avec le même milieu de culture et agitation par bullage à l'air comprimé ou par pompe. Un autre mode de culture est possible dans un photo réacteur tubulaire, essentiellement utilisé pour la culture de microalgues unicellulaires comme la chlorelle.

La culture de microalgues est généralement réalisée à un pH compris entre pH6 et pH12, de préférence à pH alcalin, plus préférentiellement à un pH compris entre pH9 et pH11, et plus préférentiellement à pH10. La culture peut être réalisée sous serre, en éclairage naturel et/ou artificiel, permettant de réaliser la photosynthèse, dans des conditions contrôlées de température, de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone. L'agitation est réalisée par une ou des pompes, une roue à aubes ou un bullage par de l'air comprimé pour assurer la circulation de la culture et un brassage en profondeur. La température de culture est comprise entre 15 et 40°C avec un optimum à 33°C.

CONFIDENTIEL

La durée de l'étape de culture de la microalgue, dans des conditions et un milieu de culture adapté, jusqu'à obtention d'une culture caractérisée par une biomasse sèche comprise de préférence entre 0,4 et 0,6 g/litre, dépend de la concentration de l'ensemencement initial et des conditions de lumière et de température appliquées à la culture, elle est typiquement comprise entre 3 et 21 jours.

Dans l'étape de préparation d'une solution aqueuse de silicium, la dissolution de silicium est réalisée dans une solution aqueuse ou dans de l'eau, et de préférence de l'eau dé-ionisée ou purifiée c'est-à-dire ne contenant pas ou très peu de minéraux, et dans un volume restreint par rapport au volume final de la culture de microalgue, le volume d'eau dans lequel est dissous le silicium est typiquement compris entre 1/20ème et 1/30ème du volume final de culture. L'eau peut être filtrée et stérilisée par irradiation UV avant d'être utilisée pour la préparation de la solution et versée dans le bassin.

Le silicium sous forme soluble se trouve essentiellement sous forme d'acide orthosilicique $Si(OH)_4$ dans les eaux de surface. A une concentration supérieure à 2mM et à pH neutre, l'acide orthosilicique polymérise en différentes formes de silice, de colloïdale à solide peu ou pas soluble. Il est donc essentiel de le maintenir en solution afin qu'il reste absorbable par la microalgue, bien que le pH préférentiellement alcalin du milieu de culture d'une microalgue soit favorable à la solubilisation de l'acide orthosilicique.

Le silicium peut être ajouté à la solution aqueuse sous la forme d'une solution ou d'une poudre, avec agitation jusqu'à dissolution complète du silicium.

Le silicium peut aussi être ajouté sous une forme combinée, par exemple sous la forme de silicate. En particulier, le silicium peut être ajouté sous la forme d'une composition choisie parmi :

- du métasilicate de sodium ou du métasilicate de potassium, qui se dissout totalement dans l'eau et libère de l'acide orthosilicique en solution. Le métasilicate de sodium ou potassium se présente sous forme de poudre ou de solution aqueuse concentrée.
- un engrais ou toute composition contenant du silicium dont tout ou partie est sous forme soluble d'acide orthosilicique.
- un amendement silicique utilisé en agriculture.

Dans le cas d'une composition sous forme de poudre, celle-ci sera ajoutée sous la forme d'une poudre dont la taille des particules est inférieure à 30 microns, de préférence inférieure à 20 microns et plus préférentiellement inférieure à 10 microns. Ceci permet, lors de la récolte des spirulines par tamisage sur une toile filtrante de maille 30 µm, que les particules soient éliminées lors du tamisage, limitant ainsi la présence de silicium sous forme minérale dans la

CONFIDENTIEL

composition comprenant les spirulines. Le silicium peut être ajouté sous la forme d'un engrais de type Agrosil broyé, caractérisé par des particules de taille inférieure à 10 microns.

Une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, peut être obtenue par la mise en œuvre d'un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la mise en culture de microalgues dans des conditions et un milieu de culture adaptés, jusqu'à l'obtention d'une culture caractérisée par une biomasse sèche comprise entre 0,1 et 2 g/litre, de préférence entre 0,2 et 1 g/litre, de préférence entre 0,3 et 0,8 g/litre, et de préférence entre 0,4 et 0,6 g/litre de culture,
b) la préparation d'une solution aqueuse de silicium et de polyphénols, le silicium étant ajouté sous la forme d'une solution, ou d'une poudre, et les polyphénols étant ajoutés sous la forme d'une solution, suivie d'un mélange par agitation de la solution ainsi obtenue jusqu'à dissolution complète du silicium et des polyphénols,
c) l'addition de la solution préparée en b) à la culture de microalgues obtenue en a),
d) la mise en culture des microalgues sous agitation pendant une durée d'au moins 12 heures,
e) la récolte d'au moins une partie de la culture de microalgues.

La préparation d'une solution aqueuse de silicium et de polyphénols, à l'étape b), peut être réalisée par l'addition de silicium à la solution aqueuse, suivie de l'addition de polyphénols, ou bien par l'addition de polyphénols à la solution aqueuse, suivie de l'addition de silicium.

Le terme « polyphénols » désigne un composé comprenant un ou plusieurs cycles benzéniques auxquels sont liés un ou plusieurs groupes hydroxyle, les groupes hydroxyle pouvant être libres ou engagés dans une autre fonction, ce terme désigne donc un grand nombre de composés possibles, regroupant des molécules simples telles que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins, et sont caractérisés par un pouvoir anti-oxydant élevé.

Les polyphénols peuvent notamment être choisis parmi : les phénols simples tels que l'hydroquinone, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, les coumarines, les naphtoquinones, les stilbénoïdes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les anthocyanes, les lignanes, les lignines, les tanins condensés.

CONFIDENTIEL

Les polyphénols sont présents dans diverses substances naturelles. C'est le cas notamment de l'anthocyanine dans les fruits rouges, des proanthocyanidines dans le chocolat et le vin, d'acides cafeoylquinique et feruloylquinique dans le café, de flavonoïdes dans les agrumes, de catéchines dans le thé vert et de quercétine dans les pommes.

Les composés phénoliques ont la propriété de se complexer partiellement avec les fonctions hydroxyles ionisées de l'acide orthosilicique en solution et ainsi de ralentir la polymérisation de l'acide orthosilicique.

L'addition de la solution de silicium et de polyphénols à la culture de microalgues conduit à une culture de microalgues dans laquelle la concentration en silicium est comprise entre 0,1 et 20 g/litre de culture, entre 0,5 et 4 g/litre de culture, entre 1 et 3 g/litre de culture et de préférence de 2 g/litre de culture, et la concentration en polyphénols est comprise entre 1 et 300 mg/litre de culture, de préférence entre 5 et 60 mg/litre de culture.

La solution de polyphénols ajoutée peut être un extrait de polyphénols naturels. En particulier, un tel extrait de polyphénols naturels peut être choisi parmi des extraits végétaux, et notamment choisi parmi :

- un extrait de polyphénols d'olives, notamment un extrait de margines d'olive,
- un extrait de polyphénols de feuilles de thé,
- un extrait de polyphénol de raisins, notamment un extrait de marc et/ou de pépins de raisin, le raisin pouvant être blanc ou rouge,
- un extrait de polyphénol de gingembre ou de romarin, et
- un mélange de ces extraits.

Ces produits se présentent sous forme de poudre de solubilité variable dans l'eau ou sous forme aqueuse concentrée. Les polyphénols d'olive ou de raisin présentent l'avantage d'être produits localement en grandes quantités et constituent des sous-produits peu coûteux des filières viticoles et oléicoles.

Selon un autre aspect particulier d'un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, selon l'invention, la solution de polyphénols comprend au moins un polyphénol d'origine synthétique. Une préparation d'acide orthosilicique stabilisée par de la choline a été autorisée comme complément alimentaire par l'EFSA (The EFSA Journal, 2009, 948, 1-23). La choline pourrait donc être utilisée comme composé permettant de maintenir l'acide orthosilicique en solution. Cependant, la choline est un produit assez coûteux et il faudrait en utiliser des

CONFIDENTIEL

quantités importantes par bassin de $25M^3$ en substitution des polyphénols de raisin, d'olive, de thé ou d'autres plantes.

Selon un aspect particulier d'un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, les microalgues sont récoltées par tamisage, centrifugation ou floculation, et de préférence par tamisage. Selon un aspect préféré, la microalgue est récoltée par tamisage sur une toile filtrante de maille comprise entre 20 et 40 microns, et de préférence de 30 microns.

Dans un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, selon l'invention, la récolte d'une fraction de la culture de microalgue commence après un temps d'incubation de la microalgue avec le silicium, et éventuellement les polyphénols compris entre 12H et 3 jours ; durant cette période, la biomasse de spiruline augmente d'au moins 20%. Selon un aspect particulier d'un procédé selon l'invention, la récolte de fractions successives de la culture de microalgue est ensuite réalisée tous les jours, selon l'état de la culture et ceci pendant une durée de 2 à 8 semaines, préférentiellement environ 3 semaines. Selon un autre aspect particulier d'un procédé selon l'invention, une nouvelle solution aqueuse de silicium, comprenant préférentiellement des polyphénols, est ajoutée environ 3 semaines après la récolte, dans le bassin de culture, pour un nouveau cycle d'enrichissement.

La quantité de microalgue récoltée chaque jour est déterminée pour ne pas mettre en péril toute la culture. Cette quantité varie de 5% à 15% de la quantité totale de microalgue dans la culture. Après chaque récolte partielle, une quantité calculée d'éléments minéraux du milieu de Zarouk, ou de tout autre milieu de culture utilisable pour ce procédé, est ajoutée dans le bassin afin de compenser les éléments minéraux consommés par les microalgues récoltées. Il est aussi possible de récolter la totalité des microalgues du bassin au bout de 8 jours de culture.

Selon un aspect particulier d'un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, la microalgue récoltée est filtrée puis séchée pour obtenir une composition de microalgue déshydratée ou partiellement déshydratée. De préférence, le séchage est effectué à une température inférieure à 60°C, pour éviter de dénaturer les principes actifs contenus dans les compositions de

CONFIDENTIEL

microalgue. Selon un aspect encore plus particulier d'un procédé selon l'invention, la poudre séchée de microalgue est broyée.

Selon un aspect particulier d'un procédé de préparation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon l'invention, après l'addition de la solution aqueuse de silicium, la concentration de silicium dans le milieu de culture lors de l'étape c) est comprise entre 0,1 et 20 g/litre de culture, entre 0,5 et 4 g/litre, entre 1 et 3 g/litre, et de préférence de 2 g/litre. L'apport des 2g/litre de silicium peut être réalisé en une seule fois ou de façon séquentielle, par exemple en 2 jours consécutifs en apportant 1g/litre de silicium le premier jour et 1g/litre de silicium le deuxième jour.

La concentration en polyphénols dans la culture est comprise entre 5 et 60 mg/litre, de préférence entre 10 et 20 mg/litre et plus préférentiellement de 12 mg/litre de culture.

L'apport des 2g/litre de silicium et de polyphénols peut être réalisé en une seule fois ou de façon séquentielle, par exemple en 2 jours consécutifs en apportant 1g/litre de silicium et de polyphénols le premier jour et 1g/litre de silicium et de polyphénols le deuxième jour.

Selon un autre aspect particulier l'invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, caractérisée en ce que la dose de silicium administrée à un sujet est comprise entre 0,3 et 1 mg/kg de poids corporel/jour, de préférence entre 0,4 et 0,8 mg/kg de poids corporel/jour, et plus préférentiellement entre 0,5 et 0,7 mg/kg de poids corporel/jour. La dose de silicium, ou quantité de silicium, administrée est la quantité de silicium total, calculée par gravimétrie.

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau pour la prévention ou le traitement d'une pathologie choisie parmi: le diabète de type 2, l'obésité nutritionnelle, les dyslipidémies, les pathologies vasculaires et l'inflammation.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet l'utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau pour la prévention ou le traitement d'une pathologie choisie parmi: le diabète de type 2, l'obésité nutritionnelle, les dyslipidémies, les pathologies vasculaires et l'inflammation, dans laquelle le patient traité présente un syndrome métabolique ou un diabète de type 2.

CONFIDENTIEL

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau pour la prévention ou le traitement de la surcharge pondérale, pour la prévention ou la diminution de l'adipogenèse ou en tant qu'agent anti-oxydant, pour la régulation de la sécrétion d'un agent choisi parmi : le TNF-α, l'IL-6, NFκB, MCP-1 plasmatique, pour la prévention ou le traitement de l'inflammation de bas niveau, ou pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au stress oxydatif.

Enfin, selon un aspect encore plus particulier, l'invention a pour objet l'utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, dans laquelle ladite microalgue est la spiruline.

La présente invention sera maintenant décrite dans des exemples, destinés à illustrer l'invention sans en diminuer la portée.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Histogramme représentant le niveau de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, en pg/mL) dans le plasma de hamsters nourris avec un régime alimentaire standard (STD), un régime enrichi en graisses (HF pour High-Fat), un régime HF additionné de spiruline enrichie en silicium (HF-SES pour Silicon Enriched Spirulina) ou un régime HF additionné de spiruline non enrichie en silicium (HF-Sp pour Spirulina), pendant 12 semaines. Les valeurs indiquent la moyenne +/- SEM (n=6). Pour chacun des régimes diététiques, les barres avec différentes lettres en index sont significativement différentes ($p<0,05$).

Figures 2A et 2B : Niveau de NADPH oxydase hépatique (Figure 2A) ou cardiaque (Figure 2B) dans le plasma de hamsters ayant reçu un régime alimentaire standard STD, HF, HF-SES ou HF-Sp pendant 12 semaines. Les valeurs indiquent la moyenne +/- SEM (n=6). Pour chacun des régimes diététiques, les barres avec différentes lettres en index sont significativement différentes ($p<0,05$).

Figures 3A et 3B : Niveau de superoxyde dismutase (Figure 3A) ou glutathion peroxydase (Figure 3B) dans le plasma de hamsters ayant reçu un régime alimentaire STD, HF, HF-SES ou HF-Sp pendant 12 semaines. Les valeurs indiquent la moyenne +/- SEM (n=6). Pour chacun des régimes diététiques, les barres avec différentes lettres en index sont significativement différentes ($p<0,05$).

CONFIDENTIEL

Figures 4A à 4D : Evaluation histologique de stéatose hépatique de hamsters nourris, respectivement, avec un régime alimentaire standard (STD, Figure 4A), HF (Figure 4B), HF-SES (Figure 4C) ou un régime HF-Sp (Figure 4D) pendant 12 semaines. Des sections représentatives de tissu hépatique (grossissement x40) sont montrées. S : capillaire sinusoidal, H : hépatocyte, N : noyau, MS : stéatose microvasculaire, PN : cellules polynucléaires. **Figures 5A et 5B** : Représentation de l'état inflammatoire indexé sur la concentration en cytokines dans le foie, respectivement le niveau de TNF-alpha (Figure 5A) ou de IL-6 (Figure 5B) de hamsters ayant reçu un régime alimentaire STD, HF, HF-SES ou HF-Sp pendant 12 semaines. Les valeurs indiquent la moyenne +/- SEM (n=6). Pour chacun des régimes diététiques, les barres avec différentes lettres en index sont significativement différentes ($p<0,05$).

Figure 6 : Activité NFκB (en ng par g de foie) dans le foie de hamsters ayant reçu un régime alimentaire STD, HF, HF-SES ou HF-Sp pendant 12 semaines. Les valeurs indiquent la moyenne +/- SEM (n=6). Pour chacun des régimes diététiques, les barres avec différentes lettres en index sont significativement différentes ($p<0,05$).

Figures 7A et 7B : Représentation de la réponse contractile à la phényléphrine. Histogramme représentant la contraction (en g) pour chacune des conditions testées, avec de G à D : STD, HF, HF-SES, HF-Sp (Fig. 7A). Représentation de la contraction (en g) pour chacune des conditions testées (STD, HF, HF-SES, HF-Sp) en fonction de la concentration en phényléphrine (en M) (Fig. 7B).

Figures 8A à 8D : Représentation de la réponse contractile des aortes soumises à des antagonistes de la contraction. Figures 8A et 8B : relaxation en réponse au SNP. Figure 8A : histogramme représentant la relaxation (en % PE de contraction) pour chacune des conditions testées, avec de gauche à droite : STD, HF, HF-SES, HF-Sp. Figure 8B : Représentation de la relaxation (en % max PE) pour chacune des conditions testées (STD (ronds clairs), HF (ronds noirs), HF-SES (carrés clairs) en fonction de la concentration en SNP (en log(SNP), en M). Figures 8C et 8D : relaxation en réponse à l'acétylcholine. Figure 8C : histogramme représentant la relaxation (en % PE de contraction) pour chacune des conditions testées, avec de G à D : STD, HF, HF-SES, HF-Sp. Figure 8D : Représentation de la relaxation (en % max PE) pour chacune des conditions testées (STD (ronds clairs), HF (ronds noirs), HF-SES (carrés clairs) en fonction de la concentration en acétylcholine (en log(acetylcholine), en M).

CONFIDENTIEL

EXEMPLES

Exemple 1 : Caractérisation de l'état métabolique, anti-oxydant et anti-inflammatoire dans un modèle animal

Production des microalgues

Les spirulines sont obtenues par la mise en culture de spiruline de la souche *Arthrospira platensis* dans un milieu de culture spécifique adapté à partir du milieu Zarouk, caractérisé par un pH compris entre 9 et 10,5, contenant, en g/L : $NaHCO_3$ 8; K_2SO_4 1; KNO_3 2; K_2SO_4 1; NaCl 5; $MgSO_4/7H_2$ 0,2; $NH_4H_2PO_4$ 0,2 ; Ferfol (Fer EDTA) 0,02 et en mg/L : $MnCl_2/4H_2O$ 117; $CuSO_4/5H_2O$ 25; $ZnSO_4/4H_2O$ 250. La culture est réalisée en bassin de 25 m^3 sous serre. L'agitation est assurée par des pompes de circulation ou des roues à aubes. L'enrichissement en silicium est réalisé en versant dans les bassins une solution concentrée de métasilicate de sodium (Na_2O_3Si) préalablement dissous en présence de polyphénols dans de l'eau déionisée dans volume de 1 M^3, ceci afin de prévenir la polymérisation du métasilicate en silice insoluble. Pour un bassin de 25 M^3, 50 kg de métasilicate de sodium sont dissous dans un volume de l'ordre de 1 M^3 d'eau dé-ionisée. Après dissolution complète du métasilicate de sodium, 300 g de polyphénols de thé sont ajoutés à la solution et celle-ci est agitée pendant 30 minutes. Les polyphénols de thé sont ajoutés sous la forme d'un extrait de feuilles de thé vert (Camellia sinensis (L.) Kuntze), sous la forme d'une poudre brune dispersible dans l'eau, contenant 98% de polyphénols, 75% de catéchines, 40% de EGCG (Epigallocatechine gallate) et 0,5% de caféine (Naturex, France, Ref. EA140374). Le métasilicate va réagir avec les polyphénols et se stabiliser. La solution est ensuite doucement versée dans le bassin de 25 M^3 contenant la culture de spiruline déjà présente à une concentration en biomasse sèche de 0,5g/litre environ. La concentration de métasilicate de sodium dans la solution initiale est de 50 g/litre afin d'obtenir une concentration finale en métasilicate de sodium de 2g/litre de culture dans les 25 M^3 du bassin. La concentration de polyphénols est de 0,3 g/litre dans la solution initiale, elle atteint 0,012g/litre dans le bassin de culture.

Après culture de la spiruline en présence de silicium et de polyphénols pendant une durée comprise entre 12 heures et 3 jours, la culture est récoltée en partie ou en totalité. La récolte d'une partie de la culture de spiruline est effectuée par filtration à travers une membrane de maille 40 microns, pressée, extrudée en filaments de 1mm de diamètre puis séchée à 40°C.

La quantité totale en silicium des spirulines ainsi produites est de 1 % de la masse sèche. Cette proportion en silicium est déterminée par dosage gravimétrique. La proportion de silicium présent sous une forme soluble dans l'eau est déterminée par extraction séquentielle en présence de solutions aqueuse d'agents de plus en plus actifs. Le protocole est répété pour toute

CONFIDENTIEL

la série d'agents d'extraction et le culot final résiduel est récupéré pour réaliser un dosage du silicium résiduel insoluble. Si le silicium est présent sous forme métabolisée disponible, il sera tout ou partie solubilisé au cours des extractions successives. La proportion de silicium soluble dans l'eau est comprise entre 30 et 60% du silicium total.

Expérimentation animale

Vingt-quatre hamsters dorés syriens mâles (Janvier-Labs, Le Genest, Saint-Isle, France) pesant 90 g en moyenne ont été répartis au hasard en quatre groupes de six animaux. Ils ont été placés à 23 ± 1°C, soumis à une photopériode de 12L/12D et traités dans le respect des règles de l'Union européenne et conformément aux lignes directrices du NIH (National Research Council, 1985) ainsi que du Comité de protection des animaux à l'Université de Montpellier (France). Un groupe a reçu un régime standard (STD), les trois autres groupes ont reçu pendant 12 semaines un régime hyperlipidique (HF), comportant 200 g/kg de caséine, 3 g/kg de L- méthionine, 393 g/kg d'amidon de maïs, 154 g/kg de saccharose, 50 g/kg de cellulose, 100 g/kg d'huile de coco hydrogénée, 2 g/kg de cholestérol, 35 g/kg de mélange minéral et 10 mg/kg de mélange vitaminique. Les hamsters de chaque groupe ont reçu par gavage soit de l'eau (régime STD, et régime HF), soit de la spiruline native non enrichie (régime HF, groupe HF -SP), soit de la spiruline enrichie en silicium (régime HF, groupe HF- SES). Dans tous les cas, le gavage intragastrique (1ml/jour/hamster) a été réalisé à partir de spiruline (SP ou SES) en suspension dans l'eau et correspondait à une dose de spiruline de 57 mg/kg de poids corporel.

Procédures analytiques

A la fin de la période expérimentale (12 semaines), les hamsters restent à jeun pendant une nuit. Des échantillons de sang sont prélevés par ponction cardiaque et le plasma est préparé par centrifugation à 2000 g pendant 10 min. Le cholestérol total (CT) et le cholestérol HDL (HDL - C) ont été déterminés en utilisant des kits enzymatiques (CH 200 et CH 203 respectivement, Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Royaume-Uni). Le cholestérol des VLDL et LDL a été précipité en utilisant le réactif au phosphotungstate (Weingand & Daggy, 1990), puis le cholestérol-HDL a été mesuré dans le surnageant. Les triglycérides plasmatiques (TG) ont été mesurés en utilisant un kit Randox (TR 1697) et la glycémie au moyen d'une technique enzymatique (KonePro, Konelab, Evry -Les- Lys, France) utilisant des réactifs fournis par Thermo Electron Corporation (Cergy Pontoise, France). L'activité de la paraoxonase (PON) a été déterminée avec le paraoxon comme substrat et mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 412 nm due à la formation de 4-nitrophénol, selon la technique selon la technique de Jaouad et al. (2006). L'insulinémie a été déterminée à l'aide d'un kit ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Suède). La concentration en « monocyte chemo-attractant protein-1 » (MCP- 1) plasmatique a

CONFIDENTIEL

été mesurée en utilisant un kit Elisa spécifique selon les instructions du fabricant (R & D Systems Europe, Lille, France). L'évaluation de la résistance à l'insuline (HOMA -IR) a été déterminée à partir des valeurs de l'insulinémie et de la glycémie à jeun selon Matthews et al. (1985) : HOMA -IR = ((glygémie à jeun (mmol/L) x insulinémie à jeun (mU/L)) / 22,5.

Le foie a été excisé, pesé et sectionné. Certains échantillons ont été utilisés pour l'histologie, tandis que d'autres ont été stockés à -80 °C jusqu'à utilisation ultérieure. Pour l'analyse anatomo-pathologique, des échantillons de foie ont été fixés dans du formaldéhyde à 10% et inclus dans de la paraffine. Des coupes de 3 micromètres d'épaisseur ont été préparées puis déparaffinées et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Des échantillons de foie non fixés ont été homogénéisés dans du tampon phosphate de potassium 0,1M refroidi à la glace (pH 7,4) et l'homogénat a été centrifugé à 13000 g pendant 15 min à 4 ° C. Le surnageant a ensuite été stocké à -80 ° C pour mesure ultérieure d'une part des activités superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx) sur un automate Pentra 400 (Horiba ABX , Montpellier , France) en utilisant les kits Ransod n° SD125 et Ransel n° RS505 respectivement (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Royaume-Uni) et d'autre part pour quantifier les taux d' IL- 6 et de TNF-α en utilisant des kits ELISA spécifiques selon les instructions du fabricant (R & D Systems Europe, Lille, France). Pour mesurer l'activité du facteur nucléaire NFκB, le tissu hépatique a été homogénéisé dans un tampon hypotonique (pH 7,9) contenant 20 mM de HEPES, 10 mM EDTA, 10 mM de KCl, un cocktail d'inhibiteurs de protéase à 1%, 0,1% de dithiothréitol et 0,1% Igepal. Des extraits nucléaires ont été ensuite obtenus par homogénéisation du culot dans un tampon de lyse (pH 7,9) contenant 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothréitol et un cocktail d'inhibiteurs de protéase à 1%. L'activité de NFκB a été déterminée à partir d'extraits nucléaires en utilisant un dosage immunologique commercial (Active Motifs, Rixensart, Belgique).

La production hépatique et cardiaque de l'anion superoxyde (O_2 °$^-$) a été évaluée par l'intensité de la chimiluminescence de lucigénine (10 microM lucigénine), mesurée avec un luminomètre (Perkin Elmer Wallac, Victor, Turku, Finlande) comme décrit précédemment par Sutra *et al*. (2007). Les résultats ont été exprimés en unités relatives de luminescence (RLU) par mg de protéine.

Résultats expérimentaux

Absorption de nourriture et gain de poids

Le tableau 1 présente les résultats obtenus : Poids corporel, absorption de nourriture, cholesterol plasmatique, triglycérides, activité paraoxonase (PON) et modèle homéostatique de

CONFIDENTIEL

résistance à l'insuline (HOMA-IR) chez des hamsters recevant un régime standard avec de l'eau (STD), un régime riche en grasses et de l'eau (HF), un régime riche en graisse et de la spiruline (HF-Sp) ou un régime riche en graisses et de la spiruline enrichie en silicium soluble (HF-SES) pendant 12 semaines.

Les hamsters nourris avec une alimentation HF (groupe High Fat contrôle) ont augmenté leur consommation alimentaire de manière significative de 27% (p = 0,0062) et leur gain de poids corporel de ~ 80% (p <0,0007) par rapport aux hamsters nourris au régime standard (STD) (Tableau 1). Les groupes recevant une alimentation HF et de la spiruline, enrichie ou non avec le silicium, à savoir les groupes HF-SES et HF-Sp, ont un gain de poids nettement inférieur à celui du groupe de contrôle de HF, soit 52% (p = 0,0001) et 44% (p = 0,0008) respectivement, bien qu'il n'y ait pas de différence de prise alimentaire entre les trois groupes (Tableau 1). Les hamsters des groupes HF-SES et HF-Sp ont une plus faible consommation de nourriture que les hamsters HF. La consommation de spiruline ou de spiruline enrichie en silicium n'entraîne aucun problème de santé chez les animaux.

Tableau 1

	STD	HF	HF-SES	HF-Sp
Gain de poids corporel (g)	32.7±5.2[a]	58.7±7.2[b]	28.6±4.3[a]	33.0±2.8[a]
Absorption de nourriture (g/jour)	4.9±0.2[a]	6.2±0.6 [b]	5.5±0.6 [b]	5.5±0.5 [b]
Taux plasmatique				
TC (mmol/L)	3.19±0.15[a]	7.26±0.26[b]	6.11±0.37[c]	6.81±0.23[b]
HDL-C (mmol/L)	1.97±0.23[a]	3.26±0.18[b]	2.52±0.16[c]	3.03±0.12[b]
LDL-C (mmol/L)	1.22±0.23[a]	4.00±0.32[b]	3.59±0.37[b]	3.78±0.24[b]
TG (mmol/L)	1.06±0.06[a]	1.73±0.27[b]	1.14±0.03[a]	1.60±0.29[ab]
PON (U/mL)	172.8±10.2[a]	118.2±11.6[b]	146.9±9.9[ab]	151.0±7.7[a]
Glucose (mmol/L)	7.78±0.13[a]	10.88±0.67[b]	12.28±0.91[b]	12.04±1.46[b]
Insuline (pmol/L)	155.4±43.1[a]	456.7±79.8[b]	127.8±43.9[a]	178.0±30.5[a]
HOMA-IR	9.98±2.90[a]	22.55±4.90[b]	9.92±0.80[a]	12.06±2.53[c]

Les valeurs sont des moyennes ± SEM (n = 6). Pour chaque régime alimentaire, les moyennes associées à des lettres différentes diffèrent, $p < 0.05$. TC : cholestérol plasmatique

CONFIDENTIEL

total, HDL-C : HDL-cholesterol, LDL-C : LDL- cholesterol, TG : triglycerides, PON : activité Paraoxonase et HOMA-IR (résistance à l'insuline) ont été mesurées après un jeûne pendant une nuit, à la fin d'une période de traitement de 12 semaines.

Analyse des lipides plasmatique

Les hamsters nourris au régime HF ont montré une dyslipidémie significative par rapport à ceux du groupe standard (STD) (Tableau 1). L'alimentation HF-Sp n'a pas induit une amélioration de ces paramètres alors que l'alimentation HF-SES a amélioré ces paramètres, excepté pour le HDL-C. On observe une diminution significative du cholestérol total et des triglycérides chez les hamsters recevant un régime HF-SES.

Par rapport au groupe STD, on observe également dans le groupe HF un taux de glucose plasmatique à jeun de 40% plus élevé (p = 0,0256) et une augmentation de 194% de la concentration d'insuline (p <0,0002), conduisant à une augmentation de 126% de la résistance à l'insuline, tel que mesuré par HOMA-IR (p = 0,0075) (Tableau 1). Bien que l'alimentation HF-SES ou HF-Sp n'ait pas amélioré la glycémie, HF-SES a particulièrement induit une diminution significative de l'insuline plasmatique (72%, p <0,0001) et HOMA-IR (56%, p = 0,0010) jusqu'à des niveaux comparables à ceux observés dans le groupe STD.

L'activité PON plasmatique est résumée dans le tableau 1. Dans le groupe de HF, son activité a été réduite d'environ 31,6% par rapport au groupe STD (p = 0,0010). Dans les groupes HF-SES et HF-SP on observe une amélioration significative de l'activité PON, d'environ 26% en moyenne par rapport aux témoins.

Dans le groupe HF, le taux plasmatique de MCP-1 est significativement élevée de 420% (p <0,0001) par rapport au groupe STD (Figure 1). Cette concentration a été significativement réduite de 28% dans le groupe HF-SES (p = 0,0380), tandis qu'un effet plus faible est observé avec HF-Sp

Stress oxydant cardiaque et hépatique

Le stress oxydant se définit comme le déséquilibre entre les oxydants et les défenses antioxydantes.

Dans le foie, la production d'anion superoxyde- (activité NADPH oxydase) a augmenté de 98% dans le groupe HF comparé au groupe standard (p<0,0001). Cette production a été significativement diminuée chez les hamsters ayant reçu un régime HF-SES et HF-Sp, avec une diminution respective de 64% et 42%, par rapport aux hamsters HF (Figure 2A). Dans le ventricule cardiaque gauche, la production d'anion superoxyde a été augmentée significativement de 101% (p<0,0001) dans le groupe HF comparé au groupe standard. Cette

CONFIDENTIEL

production a été significativement diminuée de 35% (p=0,006) et 20% (p<0,0001) chez les hamsters recevant HF-SES et HF-Sp respectivement, par comparaison avec le groupe HF (Figure 2B).

Activité des enzymes anti-oxydantes hépatiques

Dans le groupe contrôle HF, les activités superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx) ont augmenté de 35% et 75%, respectivement par comparaison avec le groupe standard (p=0,0171 et p<0,0001 respectivement) (Figures 3A et 3B). Cependant, dans les groupes HF-SES et HF-Sp, l'activité des deux enzymes a chuté de 36% (p=0,0017) et 61% (p<0,0001) respectivement pour la SOD, et de 23% (p=0,01861) et 24% (p=0,0049) respectivement pour la GPx, comparé au groupe HF.

Stéatose et inflammation hépatique

Les hamsters du groupe standard ne montrent aucun signe histologique de stéatose hépatique (Figure 4A). Les hamsters athérogènes nourris sans spiruline (Figure 4B) illustrent le développement d'une stéatose modérée à sévère, avec une inflammation indiquée par la présence répandue de cellules polynucléaires (PN), par comparaison avec des animaux ayant reçu un régime alimentaire standard (Figure 4A). La stéatose hépatique n'est pas affectée chez les animaux nourris avec de la spiruline ou de la spiruline enrichie en silicium (Figures 4C et 4D), bien que les cellules polynucléaires soient diminuées par rapport aux animaux contrôle.

Les concentrations de TNF-α et d'IL-6 dans le foie du groupe HF ont été significativement augmentées de 135% (p <0,0001) et 64% (p = 0,0015), respectivement, par rapport au groupe STD (Figure 5A et B). Cet état inflammatoire de bas grade n'a été inversé que par l'administration de la spiruline enrichie en silicium au groupe HF-SES qui présentait des niveaux de cytokines comparables à ceux du groupe STD.

Dans le groupe HF, l'activité NFκB a augmenté de manière significative (36%, p = 0,0051) par rapport au groupe STD. Seule l'administration de SES (groupe HF-SES) a induit une diminution significative de l'activité NFκB hépatique (21%, p = 0,0259) et a atteint le niveau du groupe STD (Figure 6).

Conclusions

Les effets de la spiruline enrichie en silicium (SES) sur le développement de l'athérosclérose précoce induite par une haute teneur en graisses (HF) dans l'alimentation de hamsters syriens ont été étudiés. En raison de la nature multifactorielle de l'évolution de l'athérosclérose, les caractéristiques métabolique, oxydante et inflammatoire ont été examinées. Les résultats démontrent les effets bénéfiques de la spiruline enrichie en silicium dans la

CONFIDENTIEL

prévention de désordres lipidiques ainsi que des déséquilibres oxydatifs et inflammatoires induits par l'alimentation HF.

Comme prévu, le régime alimentaire HF, caractérisé par un taux élevé d'acides gras saturés et de cholestérol a induit une augmentation significative des taux de cholestérol plasmatique après 13 semaines. L'administration de SES a partiellement empêché cette augmentation. Dans une étude précédente (Riss *et al*., 2007), il a été montré que l'administration de la spiruline enrichie en sélénium à des hamsters hypercholestérolémiques n'a pas induit une amélioration de la dyslipidémie après 13 semaines.

Le régime alimentaire HF a également induit une résistance à l'insuline (HOMA-IR), caractérisée par un taux de glucose et d'insuline plasmatique élevé. Cependant, l'administration de SES diminue l'insulinémie, résultant en une diminution de la résistance à l'insuline plus prononcée qu'après l'administration de spiruline non enrichie en silicium. Le régime HF induit une diminution de la sensibilité à l'insuline qui est généralement associée à d'autres troubles tels que le stress oxydatif et l'inflammation, les différents facteurs contribuant au développement de l'athérosclérose.

Ici, le régime HF a effectivement entraîné un stress oxydatif cardiaque et hépatique, comme en témoigne la surproduction de l'anion superoxyde (O2 ° ⁻). La NADPH oxydase est une source majeure de production d'anion superoxyde (O2 ° ⁻) et toute augmentation de son activité conduit ici à un stress oxydatif. Ceci est en accord avec des études précédentes où l'alimentation HF induit une augmentation de l'activité et de l'expression de la sous-unité $p22^{phox}$ de la NADPH oxydase. Ici, la spiruline seule et SES améliorent l'état oxydatif dans le foie et le cœur, diminuant la production d'anion superoxyde. Dans chaque organe, l'addition de SES présentait le meilleur effet.

Dans le groupe HF, les activités SOD hépatique GPx ont été efficacement améliorées par l'administration de spiruline enrichie en silicium (SES), par rapport au groupe standard. Toutefois, cette induction n'a pas empêché la surproduction hépatique d'anion superoxyde, ce qui suggère que la production de ROS pourrait submerger les mécanismes de défense enzymatiques, ce déséquilibre résultant dans un stress oxydatif du foie. Les hamsters nourris soit avec la spiruline seule ou avec SES ont montré une baisse des activités GPx et SOD similaire à celles du groupe STD. L'administration de la spiruline seule et de SES a réduit la dépendance sur les antioxydants endogènes.

L'activité PON est un autre marqueur de stress oxydatif. PON est synthétisé dans le foie et sécrété dans le plasma sous forme de protéine associée au HDL et joue un rôle majeur dans

CONFIDENTIEL

l'activité antioxydante des HDL. Il est capable d'hydrolyser les phospholipides oxydés et les produits de peroxydation des lipides, ce qui inhibe l'oxydation des LDL et HDL. En conséquence, PON pourrait protéger contre l'athérosclérose, et la modulation de son activité fait partie des cibles thérapeutiques actuelles. Le stress oxydatif associé aux régimes HF est connu pour diminuer l'activité PON, ici cette activité est considérablement réduite dans le groupe HF. La fourniture de spiruline a partiellement permis de prévenir une telle chute de l'activité PON, ce qui renforce leur potentiel antioxydant.

Globalement, SES a présenté des propriétés antioxydantes comme en témoigne la diminution de l'activité de la NADPH oxydase avec leur effet d'épargne sur les enzymes antioxydantes. Il est bien connu que la co-existence d'un état d'insulinorésistance et de stress oxydatif hépatique sont liés au développement de la stéatose hépatique non alcoolique. Ici, le groupe HF a effectivement développé une stéatose hépatique, comme en témoigne l'accumulation de lipides représentés par l'analyse histologique. Malgré la présence de cellules polynucléaires dans le foie, aucun signe de fibrose n'a été identifié, suggérant que l'étape de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) n'avait pas encore été atteinte. L'état d'inflammation de bas grade dans le foie d'animaux HF est confirmé par la surproduction de cytokines (TNF-α et IL-6), en moyenne de 90% supérieure à celle du groupe STD. Bien que les groupes recevant de la spiruline seule ou de SES n'ont montré aucune amélioration de la stéatose, ils présentent moins de cellules polynucléaires que le groupe HF. En outre, la surproduction de TNF-α et IL-6 ont été prévenus et ont atteint le niveau de référence (STD) dans le groupe SES seulement.

NFκB, un facteur de transcription sensible au stress oxydatif, est un régulateur clé de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire et les cytokines induites par NFκB contribuent largement aux maladies inflammatoires, y compris l'athérosclérose. L'amélioration de l'état inflammatoire dans le groupe SES, comme en témoigne la réduction de l'IL-6 et TNF-α, pourrait passer par une inhibition de l'activité de NFκB. Dans notre étude, seule la supplémentation SES a significativement prévenu l'activation des NFκB au niveau du foie et la production inhérente de cytokines pro-inflammatoires. L'effet antioxydant de SES a probablement contribué à l'inhibition de l'activation de NFκB. En outre MCP-1 joue un rôle critique dans le développement de maladies cardio-vasculaires. MCP-1, par son activité chimiotactique, induit une diapédèse des monocytes à partir de la lumière vers l'espace sous-endothélial où ils deviennent des cellules spumeuses, initiant la formation de stries grasses qui mènent à la formation de la plaque athérosclérotique. Ici, la supplémentation en SES réduit le

CONFIDENTIEL

niveau de MCP-1 dans le plasma, ce qui suggère que SES pourrait limiter le développement de l'athérosclérose.

En conclusion, il a été démontré que la spiruline enrichie en silicium (SES) a été en mesure d'inhiber les troubles athérogènes liées à l'alimentation. SES a amélioré le niveau de résistance à l'insuline ainsi que l'état oxydatif et inflammatoire du foie, qui sont étroitement liées au développement de l'athérosclérose. La sensibilité à l'insuline a un lien de cause à effet avec la réduction du stress oxydatif, et inversement. De même, les propriétés antioxydantes de SES ont contribué à améliorer l'état inflammatoire du foie. Les cibles moléculaires impliquées dans ces effets bénéfiques incluent l'inhibition de NFκB. Dans l'ensemble, l'administration de SES montre des effets préventifs sur les troubles liés à l'athérogénèse, notamment à l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie, le stress oxydatif et l'inflammation de bas grade, soulignant la valeur ajoutée de silicium par rapport à la spiruline non enrichie en silicium (spiruline seule). Un apport adéquat de cette spiruline de silicium enrichi pourrait être utile dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Exemple 2 : Réactivité vasculaire d'aortes isolées de hamsters soumis à un régime riche en graisses, avec supplémentation journalière en spiruline, seule ou enrichie en silicium

Conditions expérimentales

Comme dans l'exemple 1, les animaux ont reçu un régime standard équilibré (STD), un régime riche en graisses hydrogénées et en cholestérol (HF), un régime riche en graisses hydrogénées et en cholestérol et une dose journalière de spiruline enrichie en silicium à 1% (soit 0,57 mg de silicium par kg de poids d'animal) (HF-SES) ou un régime riche en graisses hydrogénées et en cholestérol et une dose journalière de spiruline non enrichie équivalente à la dose de spiruline du régime HF-SES (HF-Sp). Par « mg de silicium par kg de poids d'animal, il est entendu la quantité totale de silicium reçue par l'animal, cette quantité ayant été doées par gravimétrie.

Les expériences de réactivité vasculaire ont été réalisées sur les aortes par la méthode de mesure des variations de tension isométriques à l'aide d'un myographe (Système à organe isolé, EMKA Technologie, France). Après prélèvement, le tissu immergé dans un milieu physiologique est disséqué et nettoyé des tissus adipeux et conjonctif. L'aorte est ensuite coupée en cinq segments ou anneaux de 2 à 3 mm de longueur. Sur certains segments, l'endothélium est détruit par frottement consécutif à l'introduction d'un cure-dent dans la lumière de l'artère. Les anneaux sont montés entre deux crochets métalliques reliés à un capteur de force, immergés dans une cuve du myographe et maintenus à 37°C sous oxygénation permanente. Chaque

CONFIDENTIEL

segment est soumis à une période d'équilibre de 60 minutes à la tension initiale optimale de 1g. Les variations de tension sont enregistrées en réponse à différents agonistes et antagonistes. La viabilité de chaque anneau est tout d'abord évaluée par l'augmentation de la tension induite après addition d'une dose sub-maximale de phényléphrine (PE- 10 μml/L), la présence d'endothélium étant ensuite validée par la relaxation consécutive à l'addition d'acétylcholine (Ach- 1 μmol/L). Après plusieurs lavages et une nouvelle période de stabilisation de 30 minutes, les doses réponses sont réalisées pour évaluer dans un premier temps la fonction contractile en réponse à des doses cumulées de phényléphrine (10 nmol/L à 100 μmol/L). La fonction endothéliale est ensuite déterminée en étudiant la relaxation induite par l'addition de doses cumulées d'acétylcholine (10 nmol/L à 10 μmol/L). La relaxation endothélium indépendante induite par le sodium nitroprusside (SNP) est étudiée par l'addition de doses cumulées de SNP (1 nmol/L à 100 μmol/L) sur des anneaux dé-enthotélialisés et préalablement contractés avec la PE (10 μmol/L). Chaque protocole a été réalisé en triplicata sur des tissus provenant de 6 animaux différents.

Résultats expérimentaux

Comme indiqué dans les figures 7A et 7B, on observe une diminution de la contraction à la phényléphrine avec le régime HF en comparaison du régime standard (STD), cette diminution est prévenue avec la supplémentation en spirulines enrichies (HF-SES) et non avec la supplémentation en spirulines seules (HF-Sp). Cette diminution traduit une altération de la fonction contractile, cette altération est prévenue avec le régime SES.

L'étude de la réponse contractile des aortes soumises à des antagoniste de la contraction (=relaxation) tels que le SNP (nitroprussiate de sodium, mimétique du monoxyde d'azote (NO)) et l'acétylcholine montre qu'on observe une moins bonne relaxation induite par le SNP avec le régime HF (Figures 8A et 8B). Cette diminution de l'effet du SNP traduit une altération de la fonction contractile des artères. Cette altération est prévenue avec le régime SES puisque la relaxation induite par le SNP est identique dans le groupe HF-SES et le groupe STD.

On observe également une moins bonne relaxation à l'acétylcholine avec le régime HF (Figures 8C et 8D). Cet effet sur la relaxation traduit une dysfonction endothéliale, cette dysfonction est prévenue avec le régime SES. La réponse à l'acétylcholine n'est pas modifiée pour les animaux du groupe HF-SES par rapport aux animaux STD.

Conclusion

Des altérations de la fonction endothéliale et de la vasomotricité des artères sont observées chez l'animal alimenté avec le régime HF. Ces altérations sont prévenues par une

CONFIDENTIEL

supplémentation en spirulines enrichies en silicium mais pas par une supplémentation en spirulines non enrichies en silicium.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Loeper, J., *et al.,* 1979, *Atherosclerosis, 33,* 357-408.

Maehira, F., *et al*., (2011). *Nutr. Res., 31,* 147-56.

Refitt, D. M., *et al*., 2003, *Bone, 32,* 127-135.

Riss, J., *et al*. (2007). *J. Agric. Food Chem, 55,* 7962465,7967.

Schwarz, K. (1977). *Lancet, 1,* 454-456.

Seaborne, C. D., & Nielsen, F. H. (1993). *Nutr. Today, 28,* 13-18. 480

Sutra, T *et al*., (2007) May 16;55(10):4258-63.

Vinson *et al*., (2001), *Atherosclerosis,* 156, 67-72

Wang *et al*., (2001), *Eur. J. Pharmacol*., 427, 285-293.

Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization « *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks* », 2004, WHO Library Cataloguing-in Publication-data.

CONFIDENTIEL

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle ladite microalgue est la spiruline.

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, pour son utilisation comme médicament, comme agent cosmétique, comme composition alimentaire, comme nutraceutique ou comme complément alimentaire.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour être administrée par voie orale.

5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, pour son utilisation pour la prévention ou le traitement d'une pathologie choisie parmi : le diabète de type 2, l'obésité nutritionnelle, les dyslipidémies, les pathologies cardiovasculaires et l'inflammation.

6. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, pour son utilisation pour la prévention ou la diminution de la surcharge pondérale, pour la prévention ou la diminution de l'adipogenèse, ou en tant qu'agent anti-oxydant.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la proportion de silicium total dans ladite composition est comprise entre 0,05% et 10%, de préférence entre 0,9% et 1,5% de la masse sèche de microalgue présente dans ladite composition.

8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la dose de silicium administrée est comprise entre 0,3 et 1 mg/kg/jour.

9. Utilisation d'une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau selon l'une des revendications 1 à 8, pour la prévention ou le

CONFIDENTIEL

traitement d'une pathologie choisie parmi : le diabète de type 2, l'obésité nutritionnelle, les dyslipidémies, les pathologies cardiovasculaires et l'inflammation.

10. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle le patient présente un syndrome métabolique.

CONFIDENTIEL

ABREGE

La présente invention a pour objet une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique. Avantageusement, une composition comprenant une microalgue enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau, destinée à être utilisée pour la prévention ou le traitement d'une pathologie liée au syndrome métabolique, selon la présente invention, comprend de la spiruline enrichie en silicium sous une forme soluble dans l'eau. L'invention a également pour objet l'utilisation d'une telle composition pour la prévention ou le traitement d'une pathologie choisie parmi le diabète, l'obésité, les dyslipidémies, les pathologies cardiovasculaires, l'athérosclérose et l'inflammation. L'invention a également pour objet l'utilisation d'une telle composition pour la prévention ou la diminution d'une surcharge pondérale, pour la prévention ou la diminution de l'adipogenèse ou en tant qu'agent anti-oxydant.

CONFIDENTIEL

Conclusion & Perspectives

L'objectif majeur de ce travail est d'évaluer la capacité de la spiruline enrichie en silicium à prévenir l'athérosclérose et les perturbations liées à cette pathologie, à savoir : la dyslipidémie, le stress oxydant, l'inflammation, et la dysfonction endothéliale. Connaissant les propriétés de la spiruline brute et du silicium sur cette maladie, mon but était de savoir si l'incorporation du silicium au sein de la spiruline pouvait apporter une réelle valeur ajoutée au complément alimentaire, autrement dit, si la spiruline enrichie en silicium possède un meilleur champ d'action sur cette pathologie que la spiruline brute.

Cependant, avant de démarrer cette partie du travail, il nous a semblé nécessaire de rechercher une éventuelle toxicité de cette spiruline enrichie en silicium. En effet, des travaux ont démontré un effet toxique des nanoparticules de silicium avec l'apparition (i) de lésions de l'endothélium pulmonaire (Deb et al., 2012), (ii) d'un état pro-inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques (Skuland et al., 2014) et (iii) des réponses pro-oxydantes et pro-inflammatoires d'intensités variables sur des macrophages (Boudard et al., 2014). Toutefois, ce premier travail mené sur des rats, a permis de confirmer l'absence de toxicité, à la dose recommandée par l'EFSA pour la supplémentation humaine.

Pour l'**étude 2** (pathologie cardiovasculaire), nous avons utilisé un modèle d'athérosclérose nutritionnellement induite, mis au point au sein de notre équipe et validé dans un travail antérieur relatif à des composés phénoliques (Romain et al., 2012). La maladie est induite par un régime riche en acides gras saturés de type *trans*, connus pour leurs effets hypercholestérolémiants et athérogènes (Chen et al., 2011). Ce régime contient en très grande quantité de l'huile de coco hydrogéné (86 %), source de ces acides gras saturés.

Selon la théorie actuelle, le développement de l'athérosclérose est lié à l'apparition d'une dysfonction endothéliale, à des mécanismes oxydatifs et inflammatoires couplés à des désordres métaboliques, avec principalement la présence d'une dyslipidémie athérogène. Ces différentes composantes ont donc été évaluées sur notre modèle en présence de spiruline enrichie en silicium, et les effets de cette dernière ont été mesurés. Ceci nous a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de cette spiruline enrichie en silicium et de révéler certaines voies par lesquelles cette dernière pourrait exercer ces actions préventives.

Suite aux douze semaines d'administration du régime athéromateux, les animaux développent une dyslipidémie, caractérisée par une augmentation significative de la cholestérolémie totale,

du cholestérol-LDL et de la triglycéridémie et par un abaissement du cholestérol-HDL. Ici, seule la spiruline enrichie en silicium permet de prévenir partiellement cette dyslipidémie. Son action se fait essentiellement sur le cholestérol total avec une diminution de 16 % et sur les TG avec une réduction de 35 % par rapport au groupe athéromateux (HF). Dans notre étude, la spiruline brute n'a pas un réel effet sur la dyslipidémie, contrairement à ce que l'on peut retrouver dans la littérature. En effet, l'équipe de Cheong (Cheong et al., 2010) a mis en évidence un effet hypocholestérolémiant net de la spiruline brute chez des lapins recevant un régime high fat (régime standard enrichi à 0,5 % de cholestérol et 2 % d'huile de maïs) et supplémenté en spiruline brute à des doses autres que celle utilisée lors de notre étude (1 % et 5 % du régime administré). Ceci peut être du au modèle animal choisi, aux différentes sources de lipides présentes dans les régimes athéromateux, aux temps d'études variables mais aussi à la souche de spiruline utilisée et à sa composition.

Dans notre étude, bien que son action ne soit que partielle, les résultats nous montrent un effet synergique du silicium et de la spiruline. La spiruline enrichie en silicium apparaît donc agir sur le facteur de risque de la dyslipidémie.

La composante oxydative de la pathologie athéromateuse a été évaluée dans le foie et le cœur. Le foie représente le site principal du métabolisme et le cœur assure la circulation sanguine, ce qui en font des organes particulièrement exposés au stress oxydant.

Notre modèle pathologique induit bien une augmentation de la production d'anion superoxyde et par conséquent du stress oxydant. Cette inflation est due en partie à la hausse de l'activité d'une enzyme, la NADPH oxydase, qu'elle soit hépatique ou cardiaque. Des précédentes études au sein de notre équipe (Décordé et al., 2009; Romain et al., 2012) sont en adéquation avec cette induction du stress oxydant chez notre modèle animal, recevant le régime athéromateux. Il est intéressant de noter que la chaine respiratoire de la mitochondrie pourrait aussi être une source majeure de la production d'anion superoxyde au niveau du foie (Feillet-Coudray et al., 2009). De ce fait, il semble judicieux d'évaluer l'activité des différents complexes de la chaine respiratoire mitochondriale, impliqués dans la production d'anion superoxyde sur notre modèle d'étude.

La supplémentation en spiruline enrichie en silicium permet de prévenir le stress oxydant hépatique et cardiaque, et ce de manière beaucoup plus efficace que la spiruline non enrichie. Par conséquent, on peut dire que l'apport de silicium potentialise l'action de la spiruline à l'égard de la composante oxydative. De plus, une étude antérieure réalisée par notre équipe, a montré qu'un régime high fat induit une augmentation de l'expression de la sous-unité $p22^{phox}$

de la NADPH oxydase et que l'apport d'un extrait de pépins de raisin permet de diminuer l'expression de cette sous-unité (Décordé et al., 2009). Il serait donc intéressant de rechercher si l'effet de la spiruline enrichie en silicium passe également par une diminution de l'expression de cette enzyme.

Parallèlement à la mesure de la production d'anion superoxyde, nous avons quantifié différents marqueurs antioxydants de cette composante oxydative de la pathologie.
L'activité de la paraoxonase, qui est une estérase spécifique liée au cholestérol-HDL, est réduite de 32 % chez les animaux athéromateux par rapport au groupe standard. Son activité est rétablie de manière significative quelque soit le type de spiruline. Cependant, cette amélioration reste relative puisque l'activité enzymatique n'est pas ramenée à un niveau basal.
Nous avons également évalué l'activité de deux enzymes antioxydantes au niveau hépatique, la SOD et la GPx. Dans notre étude, le régime athéromateux induit une augmentation de l'activité de ces deux enzymes. Ces résultats sont en adéquation avec une étude menée chez le hamster Syrien doré nourri avec un régime athéromateux semblable à celui utilisé dans nos recherches (huile de noix de coco). Dans cette étude, l'activité des enzymes hépatiques et cardiaques est significativement plus élevée chez les animaux recevant le régime high fat que les animaux nourris avec le régime standard (Agbor et al., 2012). L'augmentation de la production d'anion superoxyde chez les animaux athéromateux est probablement responsable de l'accroissement de l'activité de ces enzymes antioxydantes qui fournissent un moyen de défense contre l'amplification de la production des radicaux libres.
Les activités de la SOD et de la GPx sont maintenues au niveau basal par les deux types de spiruline. On peut donc supposer que l'action menée contre le stress oxydant n'implique pas une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes de l'organisme mais pourrait résulter d'un effet « épargne » des spirulines. Il serait intéressant d'évaluer l'expression protéique de ces enzymes afin d'observer si elle est modulée par les spirulines.
De plus, de nombreuses études ont démontré que les effets antioxydants, observés lors d'une supplémentation alimentaire en polyphénols, passent par l'activation de la voie Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2) / ARE (Antioxydant Response Element) (Mann et al., 2009; Shah et al., 2010; Carmona-Ramírez et al., 2013). En effet, le Nrf2 est connu pour interagir avec le ARE qui est la principale voie régulatrice des antioxydants endogènes, notamment des enzymes de la phase II (Hème oxygénase-1, Glutathion-S-transférase…)

(Boutten et al., 2011; Negi et al., 2011; Juurlink, 2012). Il semble donc judicieux d'évaluer la modulation de cette voie de transcription sur notre modèle d'étude.
Néanmoins, on constate que l'enrichissement de la spiruline en silicium n'apporte pas de valeur ajoutée à cette microalgue concernant les enzymes antioxydantes. Il semble donc que les effets bénéfiques de la spiruline enrichie en silicium observés sur la dyslipidémie et le stress oxydant puissent impliquer d'autres mécanismes.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la composante inflammatoire de la pathologie, en évaluant des marqueurs pro-inflammatoires au niveau du plasma et du foie.
Le MCP-1 est une cytokine sécrétée par les cellules endothéliales vasculaires afin de recruter les monocytes, responsables de la phagocytose des LDL oxydés. Cela correspond à une des premières étapes initiatrices du développement de l'athérosclérose.
Dans notre étude, le régime athéromateux induit une nette augmentation du taux sanguin de MCP-1 de 420 % par rapport au groupe standard. Seule la supplémentation de spiruline enrichie en silicium diminue de façon significative ce taux de 28 %. L'apport de silicium à la spiruline potentialise donc son action bénéfique sur une des étapes clé de la pathologie.
Le régime athéromateux induit une augmentation significative des concentrations hépatiques en TNF-α et IL-6 de 136 % et 64 % respectivement, en comparaison avec le groupe standard. Cette inflammation, qualifiée de « bas niveau », est impliquée dans toutes les étapes de l'athérosclérose. Dans nos travaux, seule la supplémentation en spiruline enrichie en silicium atténue significativement la concentration hépatique en TNF-α de 49 % et en IL-6 de 30 %, permettant ainsi un retour à l'état basal.
Au vu de ces résultats, nous avons ensuite étudié l'activation d'un facteur de transcription, le NF-κB, impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires. Les animaux nourris avec les régimes athéromateux montrent une activité du facteur de transcription 36 % plus élevée que chez les animaux standard. Ici, encore un fois, seule la supplémentation en spiruline enrichie en silicium permet un abaissement de l'activation du NF-κB. Ceci est en concordance avec les résultats obtenus pour les cytokines inflammatoires.
L'ajout de silicium à la spiruline permet d'avoir un effet bénéfique sur la composante inflammatoire de la pathologie. Cette action anti-inflammatoire semble donc passer par une diminution de l'activation de NF-κB.
Il serait alors intéressant, afin d'éclaircir ce mécanisme d'action, d'évaluer la modulation de ce facteur de transcription. La spiruline enrichie en silicium pourrait-elle inhiber le complexe protéique IKKβ, empêchant *in fine* la translocation de NF-κB au niveau nucléaire ? Et par

conséquent, pourrait-elle endiguer la transcription de gènes impliqués dans la production de cytokines inflammatoires ?

En plus des dérèglements dont nous avons discuté plus haut, notre modèle d'étude développe une résistance à l'insuline caractérisée par l'HOMA-IR. Les augmentations de la production de ROS et de la concentration en cytokines pro-inflammatoires, induites par le régime athéromateux, potentialisent probablement la résistance à l'insuline.
L'apport de spiruline enrichie en silicium permet d'atténuer cette résistance à l'insuline qui se traduit par une chute de 56 %, et ce avec un meilleur effet que la spiruline brute.
Il est important de noter que la présence d'une stéatose hépatique induite par le régime athéromateux pourrait également potentialiser cette insulino-résistance. De plus, cette stéatose est concomitante d'un stress oxydant et d'une inflammation hépatique. Bien que dans notre modèle aucune fibrose n'a été révélée par l'étude histologique, le foie des hamsters présente des foyers inflammatoires diffus. Ceci suggère que la pathologie hépatique est une NAFLD qui pourrait évoluer par la suite en NASH. Il faut noter que la NAFLD constitue un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose. On se retrouve donc en présence d'une véritable boucle d'amplification entre l'athérosclérose et la NAFLD. En effet, la pathologie hépatique induite par le régime high fat peut donc amplifier les dérèglements liés au développement de l'athérosclérose : dyslipidémie, stress oxydant, inflammation et insulino-résistance.
Bien que l'étendue et la sévérité de la stéatose hépatique, en terme d'infiltration lipidique, ne soient pas prévenues par la spiruline enrichie en silicium, l'inflammation hépatique de bas niveau est légèrement diminuée par celle-ci. En effet, les foyers inflammatoires observés semblent moins nombreux avec l'apport de spiruline enrichie en silicium uniquement, ce qui corrobore les taux de cytokines pro-inflammatoires retrouvées.
De ce fait, il semble intéressant d'approfondir les travaux sur cette atteinte hépatique et sur la résistance à l'insuline, en choisissant un modèle d'étude plus adapté à ces pathologies, comme par exemple, le modèle d'obésité chez le rat Zucker.

Enfin, nous avons étudié la dernière composante liée à l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale. Celle-ci peut être caractérisée, soit par un dérèglement d'une enzyme endothéliale, la eNOS, perturbant ainsi la vasorelaxation, soit par une perte de l'élasticité de l'artère. Cela entraine donc une altération des propriétés contractiles de l'artère.
Dans notre travail, le régime athéromateux administré aux animaux induit bien une dysfonction artérielle, puisque les animaux malades réagissent moins bien aux agonistes et

antagonistes qui permettent la contraction et la relaxation des artères. Celles-ci sont uniquement rétablies par l'apport de spiruline enrichie en silicium. L'ajout de silicium dans la spiruline, potentialise l'effet du complément alimentaire sur cette composante.
Il serait donc intéressant de connaître plus précisément le mode d'action de cette spiruline enrichie en silicium sur la dysfonction endothéliale. Le silicium pourrait aussi bien agir sur le remodelage tissulaire (i) en permettant la formation de collagène de type I (Reffitt et al., 2003), (ii) en servant de lien entre les GAG et les polysaccharides (Schwarz, 1973), ou bien, il pourrait agir sur les mécanismes cellulaires (iii) en activant l'expression des eNOS (Buffoli et al., 2013), (iv) en diminuant la concentration cellulaire en calcium provoquant ainsi une relaxation (Maehira et al., 2011).

Globalement, l'incorporation du silicium dans les spirulines représente un atout positif évident vis-à-vis de la pathologie cardiovasculaire. Cette dernière démontre un effet préventif, supérieur à celui de la spiruline brute, grâce à ses actions bénéfiques sur les différentes composantes impliquées dans le développement de l'athérosclérose.

Au-delà des perspectives qu'ouvre notre travail, d'autres pistes restent à explorer, tout comme le potentiel de ce complément dans la prévention des maladies métaboliques et cardiovasculaires liées au vieillissement chez l'homme.

Enfin, les résultats obtenus ont permis le dépôt d'un brevet d'application, offrant à la société Phyco-Biotech, un nouvel intérêt commercial. La spiruline enrichie en silicium reste à ce jour le premier produit capable de livrer le silicium sous sa forme la plus biodisponible. Cet atout considérable permet à l'entreprise d'écarter toutes concurrences.

Références Bibliographiques

A

Abiru, S.; Migita, K.; Maeda, Y.; Daikoku, M.; Ito, M.; Ohata, K.; Nagaoka, S.; Matsumoto, T.; Takii, Y.; Kusumoto, K.; et al. Serum Cytokine and Soluble Cytokine Receptor Levels in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Liver Int.* **2006**, *26*, 39–45.

Adams, M. R.; Kaplan, J. R.; Manuck, S. B.; Koritnik, D. R.; Parks, J. S.; Wolfe, M. S.; Clarkson, T. B. Inhibition of Coronary Artery Atherosclerosis by 17-Beta Estradiol in Ovariectomized Monkeys. Lack of an Effect of Added Progesterone. *Atherosclerosis* **1990**, *10*, 1051–1057.

Agbor, G. A.; Akinfiresoye, L.; Sortino, J.; Johnson, R.; Vinson, J. A. Piper Species Protect Cardiac, Hepatic and Renal Antioxidant Status of Atherogenic Diet Fed Hamsters. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1354–1359.

Ait-Oufella, H.; Tedgui, A. Atherosclerosis and Diabetes. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **2008**, *101*, 3–8.

Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 539–553.

Aldhahi, W.; Hamdy, O. Adipokines, Inflammation, and the Endothelium in Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2003**, *3*, 293–298.

Alexander, C. M.; Landsman, P. B.; Teutsch, S. M.; Haffner, S. M. Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes* **2003**, *52*, 1210–1214.

Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S.; Richmond, W.; Fu, P. C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* **1974**, *20*, 470–475.

Allen, W. M. A Simple Method for Analyzing Complicated Absorption Curves, of Use in the Colorimetric Determination of Urinary Steroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1950**, *10*, 71–83.

Ambasta, R. K.; Kumar, P.; Griendling, K. K.; Schmidt, H. H. H. W.; Busse, R.; Brandes, R. P. Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with p22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active NADPH Oxidase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45935–45941.

Anfossi, G.; Russo, I.; Doronzo, G.; Pomero, A.; Trovati, M. Adipocytokines in Atherothrombosis: Focus on Platelets and Vascular Smooth Muscle Cells. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, 174341.

Anonym. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2001**, *285*, 2486–2497.

Aoun, M.; Fouret, G.; Michel, F.; Bonafos, B.; Ramos, J.; Cristol, J.-P.; Carbonneau, M.-A.; Coudray, C.; Feillet-Coudray, C. Dietary Fatty Acids Modulate Liver Mitochondrial Cardiolipin Content and Its Fatty Acid Composition in Rats with Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 439–452.

Arita, Y. Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin Acts as a Platelet-Derived Growth Factor-BB-Binding Protein and Regulates Growth Factor-Induced Common Postreceptor Signal in Vascular Smooth Muscle Cell. *Circulation* **2002**, *105*, 2893–2898.

Asakura, T.; Karino, T. Flow Patterns and Spatial Distribution of Atherosclerotic Lesions in Human Coronary Arteries. *Circ. Res.* **1990**, *66*, 1045–1066.

Aslam, T.; Delcourt, C.; Silva, R.; Holz, F. G.; Leys, A.; Garcià Layana, A.; Souied, E. Micronutrients in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol. J. Int. d'ophtalmologie. Int. J. Ophthalmol.* **2013**, *229*, 75–79.

El Assar, M.; Angulo, J.; Rodríguez-Mañas, L. Oxidative Stress and Vascular Inflammation in Aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 380–401.

Assari, T. Chronic Granulomatous Disease; Fundamental Stages in Our Understanding of CGD. *Med. Immunol.* **2006**, *5*, 1–8.

Assmann, G.; Gotto, A. M. HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation* **2004**, *109*, III8–III14.

Assmann, G.; Schulte, H.; Von Eckardstein, A.; Huang, Y. High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Predictor of Coronary Heart Disease Risk . The PROCAM Experience and Pathophysiological Implications for Reverse Cholesterol Transport. *Atherosclerosis* **1996**, *124*, S11–S20.

Auger, C.; Rouanet, J.-M.; Vanderlinde, R.; Bornet, A.; Décordé, K.; Lequeux, N.; Cristol, J.-P.; Teissedre, P.-L. Polyphenols-Enriched Chardonnay White Wine and Sparkling Pinot Noir Red Wine Identically Prevent Early Atherosclerosis in Hamsters. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9823–9829.

Aviram, M.; Vaya, J. Paraoxonase 1 Activities, Regulation, and Interactions with Atherosclerotic Lesion. *Curr. Opin. Lipidol.* **2013**, *24*, 339–344.

Ayehunie, S.; Belay, A.; Baba, T. W.; Ruprecht, R. M. Inhibition of HIV-1 Replication by an Aqueous Extract of Spirulina Platensis (Arthrospira Platensis). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1998**, *18*, 7–12.

B

Babadzhanov, A. S.; Abdusamatova, N.; Yusupova, F. M.; Faizullaeva, N.; Mezhlumyan, L. G.; Malikova, M. K. Chemical Composition of Spirulina Platensis Cultivated in Uzbekistan. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 276–279.

Badimon, J. J.; Badimon, L.; Galvez, A.; Dische, R.; Fuster, V. High Density Lipoprotein Plasma Fractions Inhibit Aortic Fatty Streaks in Cholesterol-Fed Rabbits. *Lab. Invest.* **1989**, *60*, 455–461.

Badimon, J.; Badimon, L.; Fuster, V. Regression of Atherosclerotic Lesions by High Density Lipoprotein Plasma Fraction in the Cholesterol-Fed Rabbit. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 1234–1241.

Baker, P. W.; Rye, K.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; Barter, P. J.; Hospital, R. A.; Centre, H. Ability of Reconstituted High Density Lipoproteins to Inhibit Cytokine-Induced Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 345–353.

Banji, D.; Banji, O. J. F.; Pratusha, N. G.; Annamalai, A. R. Investigation on the Role of Spirulina Platensis in Ameliorating Behavioural Changes, Thyroid Dysfunction and Oxidative Stress in Offspring of Pregnant Rats Exposed to Fluoride. *Food Chem.* **2013**, *140*, 321–331.

Barbieri, E.; Sestili, P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 982794–982810.

Barel, A.; Calomme, M.; Timchenko, A.; De Paepe, K.; Paepe, K. De; Demeester, N.; Rogiers, V.; Clarys, P.; Vanden Berghe, D. Effect of Oral Intake of Choline-Stabilized Orthosilicic Acid on Skin, Nails and Hair in Women with Photodamaged Skin. *Arch. Dermatol. Res.* **2005**, *297*, 147–153.

Barter, P. J.; Baker, P. W.; Rye, K.-A. Effect of High-Density Lipoproteins on the Expression of Adhesion Molecules in Endothelial Cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **2002**, *13*, 285–288.

Beagehold, M. Heterogeneity of Endothelial Function within the Circulation. *Curr Opin Nephrol Hypert* **1998**, *7*, 71–78.

Beckman, J. A.; Creager, M. A.; Libby, P. Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2570–2581.

Bedard, K.; Krause, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases : Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 245–313.

Beers, R. F.; Sizer, I. W. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133–140.

Bellia, J.; Birchall, J.; Roberts, N. Beer: A Dietary Source of Silicon. *Lancet* **1994**, *343*, 235.

Beltowski, J. Leptin and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2006**, *189*, 47–60.

Berlyne, G. M.; Adler, A. J.; Ferran, N.; Bennett, S.; Holt, J. Silicon Metabolism. I. Some Aspects of Renal Silicon Handling in Normal Man. *Nephron* **1986**, *43*, 5–9.

Bhattacharjee, S.; Zhao, Y.; Hill, J. M.; Percy, M. E.; Lukiw, W. J. Aluminum and Its Potential Contribution to Alzheimer's Disease (AD). *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 62.

Bissé, E.; Epting, T.; Beil, A.; Lindinger, G.; Lang, H.; Wieland, H. Reference Values for Serum Silicon in Adults. *Anal. Biochem.* **2005**, *337*, 130–135.

Bobryshev, Y. V. Monocyte Recruitment and Foam Cell Formation in Atherosclerosis. *Micron* **2006**, *37*, 208–222.

Boguszewska-czubara, A.; Pasternak, K. Silicon in Medicine and Therapy. *J. Elem.* **2011**, 489–497.

Boone, D. A.; Castenholz, R. W.; Garrity, G. M. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Boone, D. A.; Castenholz, R. W.; Garrity, G. M., Eds.; New York, **2001**; p. 1.

Boudard, D.; Forest, V.; Pourchez, J.; Boumahdi, N.; Tomatis, M.; Fubini, B.; Guilhot, B.; Cottier, M.; Grosseau, P. In Vitro Cellular Responses to Silicon Carbide Particles Manufactured through the Acheson Process: Impact of Physico-Chemical Features on pro-Inflammatory and pro-Oxidative Effects. *Toxicol. In Vitro* **2014**, *28*, 856–865.

Boulanger, C. M. Secondary Endothelial Dysfunction: Hypertension and Heart Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999**, *31*, 39–49.

Bouloumie, A.; Marumo, T.; Lafontan, M.; Busse, R. Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. *FASEB J.* **1999**, *13*, 1231–1238.

Boutten, A.; Goven, D.; Artaud-Macari, E.; Boczkowski, J.; Bonay, M. NRF2 Targeting: A Promising Therapeutic Strategy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 363–371.

Bowen, H. J. M.; Peggs, A. Determination of the Silicon Content of Food. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 1225–1229.

Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Brand, M. D. The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 466–472.

Brandes, R. P.; Weissmann, N.; Schröder, K. Nox Family NADPH Oxidases: Molecular Mechanisms of Activation. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *76C*, 208–226.

Braquet, P.; Chabrier, P.; Clostre, F. Les Fonctions de L'endothélium. *Press. Med* **1994**, *23*, 225–227.

Bubici, C.; Papa, S.; Dean, K.; Franzoso, G. Mutual Cross-Talk between Reactive Oxygen Species and Nuclear Factor-Kappa B: Molecular Basis and Biological Significance. *Oncogene* **2006**, *25*, 6731–6748.

Buesen, R.; Landsiedel, R.; Sauer, U. G.; Wohlleben, W.; Groeters, S.; Strauss, V.; Kamp, H.; van Ravenzwaay, B. Effects of SiO_2, ZrO_2, and $BaSO_4$ Nanomaterials with or without Surface Functionalization upon 28-Day Oral Exposure to Rats. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1881–1906.

Buffoli, B.; Foglio, E.; Borsani, E.; Exley, C.; Rezzani, R.; Rodella, L. F. Silicic Acid in Drinking Water Prevents Age-Related Alterations in the Endothelium-Dependent Vascular Relaxation Modulating eNOS and AQP1 Expression in Experimental Mice: An Immunohistochemical Study. *Acta Histochem.* **2013**, *115*, 418–424.

Bugianesi, E.; McCullough, A. J.; Marchesini, G. Insulin Resistance: A Metabolic Pathway to Chronic Liver Disease. *Hepatology* **2005**, *42*, 987–1000.

Bui, Q. T.; Prempeh, M.; Wilensky, R. L. Atherosclerotic Plaque Development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2109–2113.

Bursill, C. a; Choudhury, R. P.; Ali, Z.; Greaves, D. R.; Channon, K. M. Broad-Spectrum CC-Chemokine Blockade by Gene Transfer Inhibits Macrophage Recruitment and Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Circulation* **2004**, *110*, 2460–2466.

Burstein, M.; Scholnick, H. R.; Morfin, R. Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. *J. Lipid Res.* **1970**, *11*, 583–595.

Busse, R.; Fleming, I. Regulation of Endothelium-Derived Vasoactive Autacoid Production by Hemodynamic Forces. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 24–29.

C

Cai, H.; Harrison, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases : The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res.* **2000**, *87*, 840–845.

Calabresi, L.; Gomaraschi, M.; Franceschini, G. Endothelial Protection by High-Density Lipoproteins: From Bench to Bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1724–1731.

Calomme, M. R.; Vanden Berghe, D. A. Supplementation of Calves with Stabilized Orthosilicic Acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P Concentrations in Serum and the Collagen Concentration in Skin and Cartilage. *Biol. Trace Elem. Res.* **1997**, *56*, 153–165.

Candy, J. M.; Oakley, A. E.; Klinowski, J.; Carpenter, T. A.; Perry, R. H.; Atack, J. R.; Perry, E. K.; Blessed, G.; Fairbairn, A.; Edwardson, J. A. Aluminosilicates and Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Lancet* **1986**, *1*, 354–357.

Carlisle, E. M. Biochemical and Morphological Changes Associated with Long Bone Abnormalities in Silicon Deficiency. *J. Nutr.* **1980**, *110*, 1046–1056.

Carlisle, E. M. *Silicon*; O'Dell, B.; Sunde, R., Eds.; New York: Marcel Dekker, **1997**; pp. 603–618.

Carmena, R.; Duriez, P.; Fruchart, J.-C. Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Circulation* **2004**, *109*, III2–III7.

Carmona-Ramírez, I.; Santamaría, A.; Tobón-Velasco, J. C.; Orozco-Ibarra, M.; González-Herrera, I. G.; Pedraza-Chaverrí, J.; Maldonado, P. D. Curcumin Restores Nrf2 Levels and Prevents Quinolinic Acid-Induced Neurotoxicity. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 14–24.

Cases, J.; Vacchina, V.; Napolitano, A.; Caporiccio, B.; Besançon, P.; Lobinski, R.; Rouanet, J.-M. Selenium from Selenium-Rich Spirulina Is Less Bioavailable than Selenium from Sodium Selenite and Selenomethionine in Selenium-Deficient Rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2343–2350.

Cases, J.; Wysocka, I. A.; Caporiccio, B.; Jouy, N.; Besançon, P.; Szpunar, J.; Rouanet, J.-M. Assessment of Selenium Bioavailability from High-Selenium Spirulina Subfractions in Selenium-Deficient Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3867–3873.

Casey, T. R.; Bamforth, C. W. Silicon in Beer and Brewing. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 784–788.

Cash, J. G.; Kuhel, D. G.; Basford, J. E.; Jaeschke, A.; Chatterjee, T. K.; Weintraub, N. L.; Hui, D. Y. Apolipoprotein E4 Impairs Macrophage Efferocytosis and Potentiates Apoptosis by Accelerating Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27876–27884.

Castenholz, R.; Rippka, R.; Herdmann, M.; Wilmotte, A. Form-Genus I. Arthrospira Stizenberger 1852. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Boone, R. D.; Castenholz, R. W., Eds.; **2001**; pp. 542–543.

Catapano, A. L. Antioxidant Effect of Flavonoids. *Angiology* **1997**, *48*, 39–44.

Cesari, M.; Pessina, a C.; Zanchetta, M.; De Toni, R.; Avogaro, a; Pedon, L.; Dorigatti, F.; Maiolino, G.; Rossi, G. P. Low Plasma Adiponectin Is Associated with Coronary Artery Disease but Not with Hypertension in High-Risk Nondiabetic Patients. *J. Intern. Med.* **2006**, *260*, 474–483.

Chamorro, G. A.; Herrera, G.; Salazar, M.; Salazar, S.; Ulloa, V. Short-Term Toxicity Study of Spirulina in F3b Generation Rats. *J. Toxicol. Clin. expérimentale* **1988**, *8*, 163–167.

Chamorro, G.; Salazar, M.; Favila, L.; Bourges, H. Pharmacology and Toxicology of Spirulina Alga. *Rev. Investig. clínica* **1996**, *48*, 389–399.

Chamorro, G.; Salazar, S.; Favila-Castillo, L.; Steele, C.; Salazar, M. Reproductive and Peri- and Postnatal Evaluation of Spirulina Maxima in Mice. *J. Appl. Phycol.* **1997**, *9*, 107–112.

Chen, C.-L.; Tetri, L. H.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Huang, S. S.; Huang, J. S. A Mechanism by Which Dietary Trans Fats Cause Atherosclerosis. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 649–655.

Cheong, S. H.; Kim, M. Y.; Sok, D.-E.; Hwang, S.-Y.; Kim, J. H.; Kim, H. R.; Lee, J. H.; Kim, Y.-B.; Kim, M. R. Spirulina Prevents Atherosclerosis by Reducing

Hypercholesterolemia in Rabbits Fed a High-Cholesterol Diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2010**, *56*, 34–40.

Chew, E. Y. Nutrition Effects on Ocular Diseases in the Aging Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, ORSF42–ORSF47.

Chi, Z.; Melendez, A. J. Role of Cell Adhesion Molecules and Immune-Cell Migration in the Initiation, Onset and Development of Atherosclerosis. *Cell Adh. Migr.* **2007**, *1*, 171–175.

Chobanian, A. V. Exacerbation of Atherosclerosis by Hypertension. *Arch. Intern. Med.* **1996**, *156*, 1952.

Cohen, J. C.; Horton, J. D.; Hobbs, H. H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science (80-.).* **2011**, *332*, 1519–1523.

Colla, L. M.; Muccillo-baisch, A. L.; Alberto, J.; Costa, V. Spirulina Platensis Effects on the Levels of Total Cholesterol , HDL and Triacylglycerols in Rabbits Fed with a Hypercholesterolemic Diet. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2008**, *51*, 405–411.

Considine, R. V; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, a; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; McKee, L. J.; Bauer, T. L. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 292–295.

Corpet, D.-E.; Gerber, M. Alimentation Méditerranéenne et Santé. I. Caractéristiques. Maladies Cardio-Vasculaires et Autres Affections. *Médecine Nutr.* **1997**, *33*, 129–142.

Costa, J. A. V.; Colla, L. M.; Filho, P. D.; Kabke, K.; Weber, A. Modelling of Spirulina Platensis Growth in Fresh Water Using Response Surface Methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 603–607.

Crapo, J. D.; Oury, T.; Rabouille, C.; Slot, J. W.; Chang, L.-Y. Copper, Zinc Superoxide Dismutase Is Primarily a Cytosolic Protein in Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 10405–10409.

Creac'h, P.; Adrian, J. Le Silicium Dans La Chaîne Alimentaire et Sa Localisation Dans L'organisme. *Médecine Nutr.* **1990**, *26*, 73–90.

Crespo, J.; Cayón, a; Fernández-Gil, P.; Hernández-Guerra, M.; Mayorga, M.; Domínguez-Díez, a; Fernández-Escalante, J. C.; Pons-Romero, F. Gene Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha and TNF-Receptors, p55 and p75, in Nonalcoholic Steatohepatitis Patients. *Hepatology* **2001**, *34*, 1158–1163.

Cuevas, A. M.; Guasch, V.; Castillo, O.; Irribarra, V.; Mizon, C.; Martin, A. S.; Strobel, P.; Perez, D.; Germain, A. M.; Leighton, F. A High-Fat Diet Induces and Red Wine Counteracts Endothelial Dysfunction in Human Volunteers. *Lipids* **2000**, *35*, 143–148.

Cutri, B. A.; Hime, N. J.; Nicholls, S. J. High-Density Lipoproteins: An Emerging Target in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Cell Res.* **2006**, *16*, 799–808.

Cyrus, T.; Witztum, J. L.; Rader, D. J.; Tangirala, R.; Fazio, S.; Linton, M. F.; Funk, C. D. Disruption of the 12/15-Lipoxygenase Gene Diminishes Atherosclerosis in Apo E-Deficient Mice. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1597–1604.

D

Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 601–623.

Dangeard, P. Sur Une Algue Bleue Alimentaire Pour L'homme: Arthrospira Platensis (Nordstedt) Gomont. *Actes Soc. Linn. Boreaux Extr. Procés-verbaux* **1940**, *91*, 39–41.

Davies, K. J. Oxidative Stress: The Paradox of Aerobic Life. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, *61*, 1–31.

Day, C. P.; James, O. F. W. Steatohepatitis: A Tale of Two "'Hits'"? *Gastroenterology* **1998**, *114*, 842–845.

Deb, U.; Lomash, V.; Raghuvanshi, S.; Pant, S. C.; Vijayaraghavan, R. Effects of 28 Days Silicon Dioxide Aerosol Exposure on Respiratory Parameters, Blood Biochemical Variables and Lung Histopathology in Rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *34*, 977–984.

Debelle, L.; Tamburro, a. M. Elastin: Molecular Description and Function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 261–272.

Décordé, K.; Teissèdre, P.-L.; Sutra, T.; Ventura, E.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M. Chardonnay Grape Seed Procyanidin Extract Supplementation Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Hamsters by Improving Adipokine Imbalance and Oxidative Stress Markers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 659–666.

Décordé, K.; Ventura, E.; Lacan, D.; Ramos, J.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M. An SOD Rich Melon Extract Extramel Prevents Aortic Lipids and Liver Steatosis in Diet-Induced Model of Atherosclerosis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *20*, 301–307.

Dekker, J. M.; Girman, C.; Rhodes, T.; Nijpels, G.; Stehouwer, C. D. a; Bouter, L. M.; Heine, R. J. Metabolic Syndrome and 10-Year Cardiovascular Disease Risk in the Hoorn Study. *Circulation* **2005**, *112*, 666–673.

Deng, G.; Long, Y.; Yu, Y.-R.; Li, M.-R. Adiponectin Directly Improves Endothelial Dysfunction in Obese Rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int. J. Obes. (Lond).* **2010**, *34*, 165–171.

Deng, R.; Chow, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovasc. Ther.* **2010**, *28*, 33–45.

Després, J.-P. Is Visceral Obesity the Cause of the Metabolic Syndrome? *Ann. Med.* **2006**, *38*, 52–63.

Dietschy, J. M. Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentrations. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 444S – 448S.

Domingo, J. L.; Gómez, M.; Colomina, M. T. Oral Silicon Supplementation: An Effective Therapy for Preventing Oral Aluminum Absorption and Retention in Mammals. *Nutr. Rev.* **2011**, *69*, 41–51.

Doran, A. C.; Meller, N.; McNamara, C. a. Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 812–819.

Drouet, L.; Bal dit Sollier, C.; Vermillet, A.; Henry, P. Type 2 Diabetes and Atherothrombosis. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **2008**, *101*, 9–15.

Du, X.; Edelstein, D.; Obici, S.; Higham, N.; Zou, M.-H.; Brownlee, M. Insulin Resistance Reduces Arterial Prostacyclin Synthase and eNOS Activities by Increasing Endothelial Fatty Acid Oxidation. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 1071–1080.

Duriez, P. Mécanismes de Formation de La Plaque D'athérome. *Med Inter* **2004**, *25*, 3–6.

E

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products , Nutrition and Allergies on a Request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Silicon. *EFSA J.* **2004**, *60*, 1–11.

EFSA. Choline-Stabilised Orthosilicic Acid Added for Nutritional Purposes to Food Supplements. *EFSA J.* **2009a**, *948*, 1–23.

EFSA. Monomethylsilanetriol Added for Nutritional Purposes to Food Supplements. *EFSA J.* **2009b**, *950*, 1–12.

Eisinger, J.; Clairet, D. Effects of Silicon, Fluoride, Etidronate and Magnesium on Bone Mineral Density: A Retrospective Study. *Magnes. Res.* **1993**, *6*, 247–249.

Eren, E.; Yilmaz, N.; Aydin, O. Functionally Defective High-Density Lipoprotein and Paraoxonase : A Couple for Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Cholesterol* **2013**, *2013*.

Eriksen, N. T. Production of Phycocyanin--a Pigment with Applications in Biology, Biotechnology, Foods and Medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 1–14.

Exley, C. Silicon in Life : A Bioinorganic Solution to Bioorganic Essentiality. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *69*, 139–144.

Exley, C. What Is the Risk of Aluminium as a Neurotoxin? *Expert Rev. Neurother.* **2014**, *14*, 589–591.

F

Falquet, J. The Nutritional Aspects of Spirulina. *Antenna Technol.* **1997**, 1–25.

Farrar, W. V. Tecuitlatl; A Glimpse of Aztec Food Technology. *Nature* **1966**, *211*, 341–342.

Favari, E.; Calabresi, L.; Adorni, M. P.; Jessup, W.; Simonelli, S.; Franceschini, G.; Bernini, F. Small Discoidal Pre-beta1 HDL Particles Are Efficient Acceptors of Cell Cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11067–11074.

Feijóo, M.; Túnez, I.; Ruiz, A.; Tasset, I.; Muñoz, E.; Collantes, E. Oxidative Stress Biomarkers as Indicator of Chronic Inflammatory Joint Diseases Stage. *Reumatol. Clínica (English Ed.* **2010**, *6*, 91–94.

Feillet-Coudray, C.; Sutra, T.; Fouret, G.; Ramos, J.; Wrutniak-Cabello, C.; Cabello, G.; Cristol, J. P.; Coudray, C. Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat High-Sucrose Diet and Preventive Effect of Polyphenols: Involvement of Mitochondrial and NAD(P)H Oxidase Systems. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 624–632.

Fernández-Rojas, B.; Hernández-Juárez, J.; Pedraza-Chaverri, J. Nutraceutical Properties of Phycocyanin. *J. Funct. Foods* **2014**, *11*, 375–392.

Finn, A. V; Nakano, M.; Narula, J.; Kolodgie, F. D.; Virmani, R. Concept of Vulnerable/unstable Plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1282–1292.

Flaten, T. P. Aluminium as a Risk Factor in Alzheimer ' S Disease , with Emphasis on Drinking Water. *Brain Res.* **2001**, *55*, 187–196.

Flohé, L.; Günzler, W. A. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 114–121.

Florentin, M.; Liberopoulos, E. N.; Wierzbicki, A. S.; Mikhailidis, D. P. Multiple Actions of High-Density Lipoprotein. *Curr. Opin. Cardiol.* **2008**, *23*, 370–378.

Fogelstrand, P.; Borén, J. Retention of Atherogenic Lipoproteins in the Artery Wall and Its Role in Atherogenesis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2012**, *22*, 1–7.

Fossati, P.; Prencipe, L. Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme That Produces Hydrogen Peroxide. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 2077–2080.

Fox, R. *La Spiruline: Technique, Pratique et Promesse*; Edisud, Ed.; **1999**.

Frei, B.; Ames, B. Relative Importance of Vitamin E in Antiperoxidative Defenses in Human Blood Plasma and Low-Density Lipoprotein (LDL). *Vitam. E Heal. Dis.* **1992**, 131–141.

Fuhrman, B.; Partoush, A.; Volkova, N.; Aviram, M. Ox-LDL Induces Monocyte-to-Macrophage Differentiation in Vivo: Possible Role for the Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis* **2008**, *196*, 598–607.

G

Gendre, P. Altérations de L'ultrastructure de La Paroi Aortique Du Lapin Après Traitement athérogène—Action Préventive D'un Dérivé Du Silicium. *CR Soc. Biol.* **1967**, *161*, 2177–2180.

George, J.; Struthers, A. D. Role of Urate , Xanthine Oxidase and the Effects of Allopurinol in Vascular Oxidative Stress. *Vasc. Health Risk Manag.* **2009**, *5*, 265–272.

Geraldes, P.; King, G. L. Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1319–1331.

Gilbert, D. L. Fifty Years of Radical Ideas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *899*, 1–14.

Gillette Guyonnet, S.; Andrieu, S.; Vellas, B. The Potential Influence of Silica Present in Drinking Water on Alzheimer's Disease and Associated Disorders. *J. Nutr. Health Aging* **2007**, *11*, 119–124.

Gillette-Guyonnet, S.; Andrieu, S.; Nourhashemi, F.; de La Guéronnière, V.; Grandjean, H.; Vellas, B. Cognitive Impairment and Composition of Drinking Water in Women: Findings of the EPIDOS Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 897–902.

Girardin-Andréani, C. Spiruline: Système Sanguin, Système Immunitaire et Cancer. *Phytotherapie* **2005**, *3*, 158–161.

Glass, C. K.; Witztum, J. L. Atherosclerosis : The Road Ahead Review. *Cell* **2001**, *104*, 503–516.

Go, A. S.; Mozaffarian, D.; Roger, V. L.; Benjamin, E. J.; Berry, J. D.; Borden, W. B.; Bravata, D. M.; Dai, S.; Ford, E. S.; Fox, C. S.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics--

2013 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* **2013**, *127*, e6–e245.

Goldin, A.; Beckman, J. a; Schmidt, A. M.; Creager, M. a. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **2006**, *114*, 597–605.

Goldstein, J. L.; Ho, Y. K.; Basu, S. K.; Brown, M. S. Binding Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 333–337.

Gonçalves, R. B.; Coletta, R. D.; Silvério, K. G.; Benevides, L.; Casati, M. Z.; da Silva, J. S.; Nociti, F. H. Impact of Smoking on Inflammation: Overview of Molecular Mechanisms. *Inflamm. Res.* **2011**, *60*, 409–424.

González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J. L. Homeostasis of Metals in the Progression of Alzheimer's Disease. *Biometals* **2014**, *27*, 539–549.

González-Muñoz, M. J.; Meseguer, I.; Sanchez-Reus, M. I.; Schultz, A.; Olivero, R.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F. J. Beer Consumption Reduces Cerebral Oxidation Caused by Aluminum Toxicity by Normalizing Gene Expression of Tumor Necrotic Factor Alpha and Several Antioxidant Enzymes. *Food Chem. Toxicol.* **2008a**, *46*, 1111–1118.

González-Muñoz, M. J.; Peña, A.; Meseguer, I. Role of Beer as a Possible Protective Factor in Preventing Alzheimer's Disease. *Food Chem. Toxicol.* **2008b**, *46*, 49–56.

Grawish, M. E.; Zaher, A. R.; Gaafar, A. I.; Nasif, W. A. Long-Term Effect of Spirulina Platensis Extract on DMBA-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis (immunohistochemical Study). *Med. Oncol.* **2010**, *27*, 20–28.

Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*; Butterworth-Heinemann, Ed.; 2nd Editio.; Oxford, **1997**; p. 1600.

Grodstein, F.; Stamper, M. J.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C.; Rosner, B.; Speizer, F. E.; Hennekens, C. H. Postmenopausal Estrogen and Progestin Use and the Risk of Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 453–461.

Guan, X.; Qin, S.; Zhao, F.; Zhang, X.; Tang, X. Phycobilisomes Linker Family in Cyanobacterial Genomes: Divergence and Evolution. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 434–445.

Gupta, R. K.; Patel, A. K.; Shah, N.; Kumar, A.; Jha, U. K.; Yadav, U. C.; Gupta, P. K. MINI-REVIEW Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer : A Review. *Asian Pacific Cancer Prev.* **2014**, *15*, 4405–4409.

Gupta, S.; Hrishikeshvan, H. J.; Sehajpal, P. K. Spirulina Protects against Rosiglitazone Induced Osteoporosis in Insulin Resistance Rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2010**, *87*, 38–43.

H

Hamanaka, R. B.; Chandel, N. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Cellular Signaling and Dictate Biological Outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 505–513.

Handy, D. E.; Loscalzo, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 1323–1367.

Hansson, G. K. Inflammatory Mechanisms in Atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7 Suppl 1*, 328–331.

Hansson, G. K.; Robertson, A.-K. L.; Söderberg-Nauclér, C. Inflammation and Atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* **2006**, *1*, 297–329.

Hare, J. M.; Stamler, J. S. Review Series NO / Redox Disequilibrium in the Failing Heart and Cardiovascular System. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 509–517.

Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Lee, J. B.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N. Activation of Heparin Cofactor II by Calcium Spirulan. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11379–11382.

Hayakawa, Y.; Hirashima, Y.; Yamamoto, H.; Kurimoto, M.; Hayashi, T.; Lee, J.-B.; Endo, S. Mechanism of Activation of Heparin Cofactor II by Calcium Spirulan. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *416*, 47–52.

Hayashi, K.; Hayashi, T.; Kojima, I. A Natural Sulfated Polysaccharide, Calcium Spirulan, Isolated from Spirulina Platensis: In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Anti-Herpes Simplex

Virus and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1996a**, *12*, 1463–1471.

Hayashi, T.; Hayashi, K.; Maeda, M.; Kojima, I. Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga Spirulina Platensis. *J. Nat. Prod.* **1996b**, *59*, 83–87.

Heller, R.; Unbehaun, A.; Schellenberg, B.; Mayer, B.; Werner-Felmayer, G.; Werner, E. R. L-Ascorbic Acid Potentiates Endothelial Nitric Oxide Synthesis via a Chemical Stabilization of Tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40–47.

Henrotte, J. G.; Viza, D.; Vich, J. M.; Gueyne, J. The Regulatory Role of Silicon in Cell Division. *C. R. Acad. Sci. III.* **1988**, *306*, 525–528.

Hess, K.; Grant, P. J. Inflammation and Thrombosis in Diabetes. *Thromb. Haemost.* **2011**, *105 Suppl* , S43–S54.

Hibino, M.; Okumura, K.; Iwama, Y.; Mokuno, S.; Osanai, H.; Matsui, H.; Toki, Y.; Ito, T. Oxygen-Derived Free Radical-Induced Vasoconstriction by Thromboxane A2 in Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 605–610.

Hink, U.; Li, H.; Mollnau, H.; Oelze, M.; Matheis, E.; Hartmann, M.; Skatchkov, M.; Thaiss, F.; Stahl, R. A. K.; Warnholtz, A.; et al. Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* **2001**, *88*, e14–e22.

Hong, J.-H.; Kim, M.-J.; Park, M.-R.; Kwag, O.-G.; Lee, I.-S.; Byun, B. H.; Lee, S.-C.; Lee, K.-B.; Rhee, S.-J. Effects of Vitamin E on Oxidative Stress and Membrane Fluidity in Brain of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *340*, 107–115.

Horie, M.; Nishio, K.; Kato, H.; Endoh, S.; Fujita, K.; Nakamura, A.; Hagihara, Y.; Yoshida, Y.; Iwahashi, H. Evaluation of Cellular Effects of Silicon Dioxide Nanoparticles. *Toxicol. Mech. Methods* **2014**, *24*, 196–203.

Horsfall, L. J.; Nazareth, I.; Petersen, I. Cardiovascular Events as a Function of Serum Bilirubin Levels in a Large, Statin-Treated Cohort. *Circulation* **2012**, *126*, 2556–2564.

Houseknecht, K. L.; Baile, C. A.; Matteri, R. L.; Spurlock, M. E. The Biology of Leptin : A Review. *J. Anim. Sci.* **1998**, *76*, 1405–1420.

Huang, A.; Vita, J. A.; Venema, R. C.; Keaney, J. F. Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-Oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17399–17406.

Hubert, H. B.; Feinleib, M.; McNamara, P. M.; Castelli, W. P. Obesity as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease : A 26-Year Follow-up of Participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* **1983**, *67*, 968–977.

Hutadilok-Towatana, N.; Reanmogkol, W.; Satitit, S.; Panichayupakaranant, P.; Ritthisunthorn, P. A Subchronic Toxicity Study of Spirulina Platensis. *Food Sci. Technol. Res.* **2008**, *14*, 351–358.

Hutadilok-Towatana, N.; Reanmogkol, W.; Panichayupakaranant, P. Evaluation of the Toxicity of Arthrospira (Spirulina) Platensis Extract. *J. Appl. Phycol.* **2010**, *22*, 599–605.

Hwang, J.-H.; Lee, I.-T.; Jeng, K.-C.; Wang, M.-F.; Hou, R. C.-W.; Wu, S.-M.; Chan, Y.-C. Spirulina Prevents Memory Dysfunction, Reduces Oxidative Stress Damage and Augments Antioxidant Activity in Senescence-Accelerated Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* **2011**, *57*, 186–191.

I

Ichimura, M.; Kato, S.; Tsuneyama, K.; Matsutake, S.; Kamogawa, M.; Hirao, E.; Miyata, A.; Mori, S.; Yamaguchi, N.; Suruga, K.; et al. Phycocyanin Prevents Hypertension and Low Serum Adiponectin Level in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 397–405.

Ignarro, L. J. Nitric Oxide as a Unique Signaling Molecule in the Vascular System : A Historical Overview. *J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *53*, 503–514.

J

Jackson, R. L.; Busch, S. J.; Cardin, A. D. Glycosaminoglycans: Molecular Properties, Protein Interactions, and Role in Physiological Processes. *Physiol. Rev.* **1991**, *71*, 481–539.

Jacob, M. P. Extracellular Matrix Remodeling and Matrix Metalloproteinases in the Vascular Wall during Aging and in Pathological Conditions. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 195–202.

Jacqmin-Gadda, H.; Commenges, D.; Letenneur, L.; Dartigues, J. F. Silica and Aluminum in Drinking Water and Cognitive Impairment in the Elderly. *Epidemiology* **1996**, *7*, 281–285.

Janega, P.; Klimentová, J.; Barta, A.; Kovácsová, M.; Vranková, S.; Cebová, M.; Čierna, Z.; Matúsková, Z.; Jakovljevic, V.; Pechánová, O. Red Wine Extract Decreases pro-Inflammatory Markers, Nuclear Factor-κB and Inducible NOS, in Experimental Metabolic Syndrome. *Food Funct.* **2014**, *5*, 2202–2207.

Jaouad, L.; de Guise, C.; Berrougui, H.; Cloutier, M.; Isabelle, M.; Fulop, T.; Payette, H.; Khalil, A. Age-Related Decrease in High-Density Lipoproteins Antioxidant Activity Is due to an Alteration in the PON1's Free Sulfhydryl Groups. *Atherosclerosis* **2006**, *185*, 191–200.

Jocelyn, P. C. Spectrophotometric Assay of Thiols. *Methods Enzymol.* **1987**, *143*, 44–67.

Jomova, K.; Valko, M. Health Protective Effects of Carotenoids and Their Interactions with Other Biological Antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 102–110.

Joventino, I. P.; Alves, H. G. R.; Neves, L. C.; Pinheiro-Joventino, F.; Leal, L. K. A. M.; Neves, S. A.; Ferreira, F. V.; Brito, G. A. C.; Viana, G. B. The Microalga Spirulina Platensis Presents Anti-Inflammatory Action as Well as Hypoglycemic and Hypolipidemic Properties in Diabetic Rats. *J. Complement. Integr. Med.* **2012**, *9*, Article 17.

Jugdaohsingh, R. Silicon and Bone Health. *J. Nutr. Heal. Aging* **2007**, *11*, 99–110.

Jugdaohsingh, R.; Reffitt, D. M.; Oldham, C.; Day, J. P.; Fifield, L. K.; Thompson, R. P.; Powell, J. J. Oligomeric but Not Monomeric Silica Prevents Aluminum Absorption in Humans. *Am J Clin Nutr* **2000**, *71*, 944–949.

Jugdaohsingh, R.; Anderson, S. H. C.; Tucker, K. L.; Elliott, H.; Kiel, D. P.; Thompson, R. P. H.; Powell, J. J. Dietary Silicon Intake and Absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 887–893.

Jugdaohsingh, R.; Tucker, K. L.; Qiao, N.; Cupples, L. A.; Kiel, D. P.; Powell, J. J. Dietary Silicon Intake Is Positively Associated with Bone Mineral Density in Men and Premenopausal Women of the Framingham Offspring Cohort. *J. Bone Miner. Res.* **2004**, *19*, 297–307.

Junquero, D.; Rival, Y.; Fabre, L. P. Syndrome Métabolique : Quelle Définition Pour Quel (S) Traitement (S) ? Critères Diagnostiques. **2005**.

Jurkić, L. M.; Cepanec, I.; Pavelić, S. K.; Pavelić, K. Biological and Therapeutic Effects of Ortho-Silicic Acid and Some Ortho-Silicic Acid-Releasing Compounds: New Perspectives for Therapy. *Nutr. Metab. (Lond).* **2013**, *10*, 2.

Juurlink, B. H. J. Dietary Nrf2 Activators Inhibit Atherogenic Processes. *Atherosclerosis* **2012**, *225*, 29–33.

K

Kalita, J.; Kumar, V.; Misra, U. K.; Ranjan, A.; Khan, H.; Konwar, R. A Study of Oxidative Stress, Cytokines and Glutamate in Wilson Disease and Their Asymptomatic Siblings. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *274*, 141–148.

Kaneto, H.; Katakami, N.; Matsuhisa, M.; Matsuoka, T. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, 453892.

Kannel, W. B. Some Lessons in Cardiovascular From Framingham Epidemiology. *Am. J. Cardiol.* **1976**, *37*, 269–282.

Kannel, W. B.; Wolf, P. A. Pulling It All Together: Changing the Cardiovascular Outlook. *Am. Heart J.* **1992**, *123*, 264–267.

Karimi, G.; Houée Levin, C.; Dagher, M. C.; Baciou, L.; Bizouarn, T. Assembly of Phagocyte NADPH Oxidase: A Concerted Binding Process? *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 3277–3283.

Katusic, Z. S.; Schugel, J.; Cosentino, F.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-Dependent Contractions to Oxygen-Derived Free Radicals in the Canine Basilar Artery. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **1993**, *264*, H859–H864.

Keeting, P. E.; Oursler, M. J.; Wiegand, K. E.; Bonde, S. K.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. Zeolite A Increases Proliferation, Differentiation, and Transforming Growth Factor Beta Production in Normal Adult Human Osteoblast-like Cells in Vitro. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 1281–1289.

Khemayanto, H.; Shi, B. Role of Mediterranean Diet in Prevention and Management of Type 2 Diabetes. *Chin. Med. J. (Engl).* **2014**, *127*, 3651–3656.

Kim, E. K.; Choi, E.-J. Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 396–405.

Kim, M.-H.; Bae, Y.-J.; Choi, M.-K.; Chung, Y.-S. Silicon Supplementation Improves the Bone Mineral Density of Calcium-Deficient Ovariectomized Rats by Reducing Bone Resorption. *Biol. Trace Elem. Res.* **2009**, *128*, 239–247.

Kjellén, L.; Lindahl, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443–475.

Klein, E. A.; Thompson, I. M.; Tangen, C. M.; Crowley, J. J.; Lucia, M. S.; Goodman, P. J.; Minasian, L. M.; Ford, L. G.; Parnes, H. L.; Gaziano, J. M.; et al. Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **2011**, *306*, 1549–1556.

Klinger, J. R. The Nitric oxide/cGMP Signaling Pathway in Pulmonary Hypertension. *Clin. Chest Med.* **2007**, *28*, 143–167, ix.

Koechlin-Ramonatxo, C. Oxygène, Stress Oxydant et Supplémentations Antioxydantes Ou Un Aspect Différent de La Nutrition Dans Les Maladies Respiratoires. *Nutr. Clin. Métabolisme* **2006**, *20*, 165–177.

Koschinsky, M. L.; Boffa, M. B. Lipoprotein(a): An Important Cardiovascular Risk Factor and a Clinical Conundrum. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2014**, *43*, 949–962.

Kotronen, A.; Yki-Järvinen, H. Fatty Liver: A Novel Component of the Metabolic Syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 27–38.

Ku, C. S.; Yang, Y.; Park, Y.; Lee, J. Health Benefits of Blue-Green Algae: Prevention of Cardiovascular Disease and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 103–111.

Kuddus, M.; Singh, P.; Thomas, G.; Al-Hazimi, A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 742859.

Kühn, H.; O'Donnell, V. B. Inflammation and Immune Regulation by 12/15-Lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 334–356.

Kumar, S. S.; Shankar, B.; Sainis, K. B. Effect of Chlorophyllin against Oxidative Stress in Splenic Lymphocytes in Vitro and in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1672*, 100–111.

Kurowska, E. M. Nitric Oxide Therapies in Vascular Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 155–166.

Kuvin, J. T.; Rämet, M. E.; Patel, A. R.; Pandian, N. G.; Mendelsohn, M. E.; Karas, R. H. A Novel Mechanism for the Beneficial Vascular Effects of High-Density Lipoprotein Cholesterol: Enhanced Vasorelaxation and Increased Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Am. Heart J.* **2002**, *144*, 165–172.

L

Lacolley, P.; Regnault, V.; Nicoletti, A.; Li, Z.; Michel, J.-B. The Vascular Smooth Muscle Cell in Arterial Pathology: A Cell That Can Take on Multiple Roles. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *95*, 194–204.

Lagrost, L.; Masson, D.; Chapman, J.; Jacob, M. Lipoprotéines et Métabolisme Lipidique. *Société Française d'Athérosclérose* **2005**.

Lai, G. Y.; Weinstein, S. J.; Albanes, D.; Taylor, P. R.; Virtamo, J.; McGlynn, K. A.; Freedman, N. D. Association of Serum A-Tocopherol, B-Carotene, and Retinol with Liver Cancer Incidence and Chronic Liver Disease Mortality. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 2163–2171.

Lakshmi, P.; Uma, M. Sequence and Structure Comparison Studies of Phycocyanin in Spirulina Platensis. *J. Comput. Sci. Syst. Biol.* **2008**, *1*, 63–72.

Lambeth, J. D. NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 181–189.

Lanfer-Marquez, U. M.; Barros, R. M. C.; Sinnecker, P. Antioxidant Activity of Chlorophylls and Their Derivatives. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 885–891.

Leclercq, I.; Sempoux, C. Non-Alcoholic Fatty Leaver Disease : From Steatosis to Cirrhosis. *Acta Endoscopica* **2006**, *36*, 299–314.

Lee, J. B.; Srisomporn, P.; Hayashi, K.; Tanaka, T.; Sankawa, U.; Hayashi, T. Effects of Structural Modification of Calcium Spirulan, a Sulfated Polysaccharide from Spirulina Platensis, on Antiviral Activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **2001**, *49*, 108–110.

Lehoux, S.; Tedgui, A. [Shear and Signal Transduction in the Endothelial Cell]. *Med. Sci. (Paris).* **2004**, *20*, 551–556.

Léonard, J.; Compère, P. Spirulina Platensis (Gom.) Geitl., Algue Bleue de Grande Valeur Alimentaire Par Sa Richesse En Proteines. *Bull. du Jard. Bot. Natl. Belgique* **1967**, *37*, 1–23.

Leung, T.-M.; Nieto, N. CYP2E1 and Oxidant Stress in Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 395–398.

Levine, R. L. Carbonyl Modified Proteins in Cellular Regulation, Aging, and disease2,3 2Guest Editor: Earl Stadtman 3This Article Is Part of a Series of Reviews on "Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease." The Full List of Papers May Be Found on the Homepag. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 790–796.

Lewis, J. R.; Mohanty, S. R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Dig. Dis. Sci.* **2010**, *55*, 560–578.

Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I.; Nourshargh, S. Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678–689.

Li, H.; Horke, S.; Förstermann, U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2014**, *237*, 208–219.

Li, X.; Fang, P.; Mai, J.; Choi, E. T.; Wang, H.; Yang, X. Targeting Mitochondrial Reactive Oxygen Species as Novel Therapy for Inflammatory Diseases and Cancers. *J. Hematol. Oncol.* **2013**, *6*, 19.

Liang, Y.; Sun, W.; Zhu, Y.-G.; Christie, P. Mechanisms of Silicon-Mediated Alleviation of Abiotic Stresses in Higher Plants: A Review. *Environ. Pollut.* **2007**, *147*, 422–428.

Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *420*, 868–874.

Libby, P. The Molecular Mechanisms of the Thrombotic Complications of Atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **2008**, *263*, 517–527.

Lieber, C. S.; Leo, M. A.; Mak, K. M.; Xu, Y.; Cao, Q.; Ren, C.; Ponomarenko, A.; DeCarli, L. M. Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 502–509.

Lippman, S. M.; Klein, E. A.; Goodman, P. J.; Lucia, M. S.; Thompson, I. M.; Ford, L. G.; Parnes, H. L.; Minasian, L. M.; Gaziano, J. M.; Hartline, J. A.; et al. Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **2009**, *301*, 39–51.

Liu, J.; Wang, X.; Pang, G. Effects of Temperature and Light on Content of Polysaccharides and Activity of SOD in Spirulina Maxima. *Sci. Technol. Food Ind.* **2008**.

Lloyd-Jones, D.; Adams, R.; Carnethon, M.; De Simone, G.; Ferguson, T. B.; Flegal, K.; Ford, E.; Furie, K.; Go, A.; Greenlund, K.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2009 Update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **2009**, *119*, e21–e181.

Loeper, J.; Goy-Loeper, J.; Rozensztajn, L.; Fragny, M. The Antiatheromatous Action of Silicon. *Atherosclerosis* **1979**, *33*, 397–408.

Loeper, J.; Goy, J.; Fragny, M.; Troniou, R.; Bedu, O. Study of Fatty Acids in Atheroma Induced in Rabbits by an Atherogenic Diet with or without Silicon I.V. Treatment. *Life Sci.* **1988**, *42*, 2105–2112.

Loft, S.; Møller, P.; Cooke, M. S.; Rozalski, R.; Olinski, R. Antioxidant Vitamins and Cancer Risk: Is Oxidative Damage to DNA a Relevant Biomarker? *Eur. J. Nutr.* **2008**, *47 Suppl 2*, 19–28.

Loria, P.; Lonardo, a; Bellentani, S.; Day, C. P.; Marchesini, G.; Carulli, N. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Cardiovascular Disease: An Open Question. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *17*, 684–698.

Lötzer, K.; Funk, C. D.; Habenicht, A. J. R. The 5-Lipoxygenase Pathway in Arterial Wall Biology and Atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1736*, 30–37.

Luscinskas, F. W.; Cybulsky, M. I.; Kiely, J. M.; Peckins, C. S.; Davis, V. M.; Gimbrone, M. A. Cytokine-Activated Human Endothelial Monolayers Support Enhanced Neutrophil Transmigration via a Mechanism Involving Both Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1. *J. Immunol.* **1991**, *146*, 1617–1625.

Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, 233–241.

M

Mackness, B.; Hine, D.; Liu, Y.; Mastorikou, M.; Mackness, M. Paraoxonase-1 Inhibits Oxidised LDL-Induced MCP-1 Production by Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *318*, 680–683.

Mackness, M. I.; Durrington, P. N.; Mackness, B. How High-Density Lipoprotein Protects against the Effects of Lipid Peroxidation. *Curr. Opin. Lipidol.* **2000**, *11*, 383–388.

Maehira, F.; Motomura, K.; Ishimine, N.; Miyagi, I.; Eguchi, Y.; Teruya, S. Soluble Silica and Coral Sand Suppress High Blood Pressure and Improve the Related Aortic Gene Expressions in Spontaneously Hypertensive Rats. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 147–156.

Majdoub, H.; Ben Mansour, M.; Chaubet, F.; Roudesli, M. S.; Maaroufi, R. M. Anticoagulant Activity of a Sulfated Polysaccharide from the Green Alga Arthrospira Platensis. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1377–1381.

Mäkinen, P. I.; Lappalainen, J. P.; Heinonen, S. E.; Leppänen, P.; Lähteenvuo, M. T.; Aarnio, J. V; Heikkilä, J.; Turunen, M. P.; Ylä-Herttuala, S. Silencing of Either SR-A or CD36

Reduces Atherosclerosis in Hyperlipidaemic Mice and Reveals Reciprocal Upregulation of These Receptors. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *88*, 530–538.

Mani, U. V.; Desai, S.; Iyer, U. Studies on the Long-Term Effect of Spirulina Supplementation on Serum Lipid Profile and Glycated Proteins in NIDDM Patients. *J. nutraceuticals, Funct. Med. foods* **2000**, *2*, 25–32.

Mann, G. E.; Bonacasa, B.; Ishii, T.; Siow, R. C. Targeting the Redox Sensitive Nrf2-Keap1 Defense Pathway in Cardiovascular Disease: Protection Afforded by Dietary Isoflavones. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 139–145.

Mann, J. Diet and Risk of Coronary Heart Disease and Type 2 Diabetes. *Lancet* **2002**, *360*, 783–789.

Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Stamper, M. J.; Willett, W. C.; Rosner, B.; Monson, R. R.; E, S. F.; Hennekens, C. H. A Prospective Study of Obesity and Risk of Coronary Heart Disease In Women. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322*, 882–889.

Marcus, R. Clinical Review 76: The Nature of Osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 1–5.

Marklund, S. L. Human Copper-Containing Superoxide Dismutase of High Molecular Weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 7634–7638.

Marklund, S. Spectrophotometric Study of Spontaneous Disproportionation of Superoxide Anion Radical and Sensitive Direct Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7504–7507.

Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474.

Martin, K. R. The Chemistry of Silica and Its Potential Health Benefits. *J. Nutr. Health Aging* **2007**, *11*, 94–97.

Martín-Timón, I.; Sevillano-Collantes, C.; Segura-Galindo, A.; Del Cañizo-Gómez, F. J. Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: Have All Risk Factors the Same Strength? *World J. Diabetes* **2014**, *5*, 444–470.

Martinon, F. Signaling by ROS Drives Inflammasome Activation. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 616–619.

Matthews, D. R.; Hosker, J. P.; Rudenski, A. S.; Naylor, B. A.; Treacher, D. F.; Turner, R. C. Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Beta-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419.

McNaughton, S. A.; Bolton-Smith, C.; Mishra, G. D.; Jugdaohsingh, R.; Powell, J. J. Dietary Silicon Intake in Post-Menopausal Women. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 813–817.

McQuistan, T. J.; Simonich, M. T.; Pratt, M. M.; Pereira, C. B.; Hendricks, J. D.; Dashwood, R. H.; Williams, D. E.; Bailey, G. S. Cancer Chemoprevention by Dietary Chlorophylls: A 12,000-Animal Dose-Dose Matrix Biomarker and Tumor Study. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 341–352.

Mensink, R. P.; Zock, P. L.; Kester, A. D. M.; Katan, M. B. Effects of Dietary Fatty Acids and Carbohydrates on the Ratio of Serum Total to HDL Cholesterol and on Serum Lipids and Apolipoproteins: A Meta-Analysis of 60 Controlled Trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1146–1155.

Mestas, J.; Ley, K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **2008**, *18*, 228–232.

Meunier, J. D. Le Rôle Des Plantes Dans Le Transfert Du Silicium À La Surface Des Continents. *Comptes Rendus - Geosci.* **2003**, *335*, 1199–1206.

Miller, D. M.; Aust, S. D. Studies of Ascorbate-Dependent, Iron-Catalyzed Lipid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *271*, 113–119.

Milstien, S.; Katusic, Z. Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 681–684.

Mineo, C.; Deguchi, H.; Griffin, J. H.; Shaul, P. W. Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1352–1364.

Motoshima, H.; Wu, X.; Mahadev, K.; Goldstein, B. J. Adiponectin Suppresses Proliferation and Superoxide Generation and Enhances eNOS Activity in Endothelial Cells Treated with Oxidized LDL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 264–271.

Mottillo, S.; Filion, K. B.; Genest, J.; Joseph, L.; Pilote, L.; Poirier, P.; Rinfret, S.; Schiffrin, E. L.; Eisenberg, M. J. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk a Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *56*, 1113–1132.

Moukarzel, A.; Song, M.; Buchman, A.; Ament, M. Silicon Deficiency May Be Involved in Bone Disease of Parenteral Nutrition. *J. Am. Coll. Nutr.* **1992**, *11*, 584.

Moura, L. P.; Puga, G. M.; Beck, W. R.; Teixeira, I. P.; Ghezzi, A. C.; Silva, G. A.; Mello, M. A. R. Exercise and Spirulina Control Non-Alcoholic Hepatic Steatosis and Lipid Profile in Diabetic Wistar Rats. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*, 77.

Muga, M. A.; Chao, J. C.-J. Effects of Fish Oil and Spirulina on Oxidative Stress and Inflammation in Hypercholesterolemic Hamsters. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 470.

Mühling, M.; Harris, N.; Belay, A.; Whitton, B. A. Reversal of Helix Orientation in the Cyanobacterium Arthrospira. *J. Phycol.* **2003**, *39*, 360–367.

Murphy, M. P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13.

N

Nagaoka, S.; Shimizu, K.; Kaneko, H.; Shibayama, F.; Morikawa, K.; Kanamaru, Y.; Otsuka, A.; Hirahashi, T.; Kato, T. Nutrient Interactions and Toxicity A Novel Protein C-Phycocyanin Plays a Crucial Role in the Hypocholesterolemic Action of Spirulina Platensis Concentrate in Rats. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2425–2430.

Nappo, F.; Esposito, K.; Cioffi, M.; Giugliano, G.; Molinari, A. M.; Paolisso, G.; Marfella, R.; Giugliano, D. Postprandial Endothelial Activation in Healthy Subjects and in Type 2

Diabetic Patients: Role of Fat and Carbohydrate Meals. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 1145–1150.

Nathan, C.; Sporn, M. Cytokines in Context. *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 981–986.

Nauseef, W. M. Assembly of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, *122*, 277–291.

Navab, M.; Hama, S. Y.; Anantharamaiah, G. M.; Hassan, K.; Hough, G. P.; Watson, A. D.; Reddy, S. T.; Sevanian, A.; Fonarow, G. C.; Fogelman, A. M. Normal High Density Lipoprotein Inhibits Three Steps in the Formation of Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein : Steps 2 and 3. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1495–1508.

Negi, G.; Kumar, A.; Joshi, R. P.; Sharma, S. S. Oxidative Stress and Nrf2 in the Pathophysiology of Diabetic Neuropathy: Old Perspective with a New Angle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *408*, 1–5.

Neuzil, J.; Stocker, R. Free and Albumin-Bound Bilirubin Are Efficient Co-Antioxidants for a-Tocopherol , Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *24*, 16712–16719.

Nielsen, F. H. A Novel Silicon Complex Is as Effective as Sodium Metasilicate in Enhancing the Collagen-Induced Inflammatory Response of Silicon-Deprived Rats. *J. trace Elem. Med. Biol.* **2008**, *22*, 39–49.

Nielsen, F. H. Update on the Possible Nutritional Importance of Silicon. *J. trace Elem. Med. Biol.* **2014**.

Nistor, A.; Bulla, A.; Filip, D. A.; Radu, A. The Hyperlipidemic Hamster as a Model of Experimental Atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1987**, *68*, 159–173.

Norata, G. D.; Callegari, E.; Marchesi, M.; Chiesa, G.; Eriksson, P.; Catapano, A. L. High-Density Lipoproteins Induce Transforming Growth Factor-beta2 Expression in Endothelial Cells. *Circulation* **2005**, *111*, 2805–2811.

O

O'Donoghue, M. L.; Morrow, D. A.; Tsimikas, S.; Sloan, S.; Ren, A. F.; Hoffman, E. B.; Desai, N. R.; Solomon, S. D.; Domanski, M.; Arai, K.; et al. Lipoprotein(a) for Risk Assessment in Patients with Established Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 520–527.

Ou, Y.; Zheng, S.; Lin, L.; Li, Q. C-Phycocyanin from Spirulina Maxima Protects Hepatocytes against Oxidative Damage Induced by H2O2 in Vitro. *Biomed. Prev. Nutr.* **2011**, *1*, 8–11.

Ouchi, N.; Walsh, K. A Novel Role for Adiponectin in the Regulation of Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1219–1221.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Nishida, M.; Matsuyama, A.; Okamoto, Y.; Ishigami, M.; Kuriyama, H.; Kishida, K.; Nishizawa, H.; et al. Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circualtion* **2001**, *103*, 1057–1063.

Ouchi, N.; Ohishi, M.; Kihara, S.; Funahashi, T.; Nakamura, T.; Nagaretani, H.; Kumada, M.; Ohashi, K.; Okamoto, Y.; Nishizawa, H.; et al. Association of Hypoadiponectinemia with Impaired Vasoreactivity. *Hypertension* **2003**, *42*, 231–234.

Ouedraogo, R.; Gong, Y.; Berzins, B.; Wu, X.; Mahadev, K.; Hough, K.; Chan, L.; Goldstein, B. J.; Scalia, R. Adiponectin Deficiency Increases Leukocyte-Endothelium Interactions via Upregulation of Endothelial Cell Adhesion Molecules in Vivo. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1718–1726.

Ouhtit, A.; Ismail, M. F.; Othman, A.; Fernando, A.; Abdraboh, M. E.; El-Kott, A. F.; Azab, Y. A.; Abdeen, S. H.; Gaur, R. L.; Gupta, I.; et al. Chemoprevention of Rat Mammary Carcinogenesis by Spirulina. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 296–303.

Owens, G. K.; Kumar, M. S.; Wamhoff, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* **2004**, *S4*, 767–801.

P

Pabon, M. M.; Jernberg, J. N.; Morganti, J.; Contreras, J.; Hudson, C. E.; Klein, R. L.; Bickford, P. C. A Spirulina-Enhanced Diet Provides Neuroprotection in an A-Synuclein Model of Parkinson's Disease. *PLoS One* **2012**, *7*, e45256.

Paclet, M. H.; Coleman, A. W.; Vergnaud, S.; Morel, F. P67-Phox-Mediated NADPH Oxidase Assembly: Imaging of Cytochrome b558 Liposomes by Atomic Force Microscopy. *Biochemistry* **2000**, *39*, 9302–9310.

Paglia, D. E.; Valentine, W. N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **1967**, *70*, 158–169.

Pak, W.; Takayama, F.; Mine, M.; Nakamoto, K.; Kodo, Y.; Mankura, M. Anti Oxidative and Anti Inflammatory Effects of Spirulina on Rat Model of Non Alcoholic Steatohepatitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2012**, *51*, 227–234.

Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Ruiz, C.; Gredilla, R.; Herrero, A.; Barja, G. Double Bond Content of Phospholipids and Lipid Peroxidation Negatively Correlate with Maximum Longevity in the Heart of Mammals. *Mech. Ageing Dev.* **2000**, *112*, 169–183.

Paneni, F.; Beckman, J. a; Creager, M. a; Cosentino, F. Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 2436–2443.

Paniagua-Michel, J.; Dujardin, E.; Sironval, C. Le *tecuitlatl*, Concentré de Spirulines Source de Protéines Comestibles Chez Les Aztèques. *Cah. Agric.* **1993**, *2*, 283–287.

Paredes-Carbajal, M. C.; Torres-Duran, P. V.; Rivas-Arancibia, S.; Zamora-Gonzales, J.; Mascher, D.; Juarez-Oropeza, M. A. Effect of Dietary Spirulinu Maxima on Vasomotor Responses of Aorta Rings from Rats Fed a Fructose-Rich Diet. *Nutr. Res.* **1998**, *18*, 1769–1782.

Parekh, S.; Anania, F. a. Abnormal Lipid and Glucose Metabolism in Obesity: Implications for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 2191–2207.

Park, J. B.; Charbonneau, F.; Schiffrin, E. L. Correlation of Endothelial Function in Large and Small Arteries in Human Essential Hypertension. *J. Hypertens.* **2001**, *19*, 415–420.

Parmar, A.; Singh, N. K.; Pandey, A.; Gnansounou, E.; Madamwar, D. Cyanobacteria and Microalgae: A Positive Prospect for Biofuels. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10163–10172.

Passerini, A. G.; Polacek, D. C.; Shi, C.; Francesco, N. M.; Manduchi, E.; Grant, G. R.; Pritchard, W. F.; Powell, S.; Chang, G. Y.; Stoeckert, C. J.; et al. Coexisting Proinflammatory and Antioxidative Endothelial Transcription Profiles in a Disturbed Flow Region of the Adult Porcine Aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 2482–2487.

Peluffo, G.; Calcerrada, P.; Piacenza, L.; Pizzano, N.; Radi, R. Superoxide-Mediated Inactivation of Nitric Oxide and Peroxynitrite Formation by Tobacco Smoke in Vascular Endothelium: Studies in Cultured Cells and Smokers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H1781–H1792.

Peluso, M. R.; Schneeman, B. O. A Food-Grade Silicon Dioxide Is Hypocholesterolemic in the Diet of Cholesterol-Fed Rats. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 853–860.

Pennington, J. A. Silicon in Foods and Diets. *Food Addit. Contam.* **1991**, *8*, 97–118.

Pérez-Granados, A. M.; Vaquero, M. P. Silicon, Aluminium, Arsenic and Lithium: Essentiality and Human Health Implications. *J. Nutr. Heal. Agingutrition, Heal. aging* **2002**, *6*, 154–162.

Pérez-Carreras, M.; Del Hoyo, P.; Martin, M. A.; Rubio, J. C.; Martin, A.; Castellano, G.; Colina, F.; Arenas, J.; Solis-Herruzo, J. A. Defective Hepatic Mitochondrial Respiratory Chain in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2003**, *38*, 999–1007.

Perl, D. P. Relationship of Aluminum to Alzheimer's Disease. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *63*, 149–153.

Perry, C. C.; Keeling-Tucker, T. Aspects of the Bioinorganic Chemistry of Silicon in Conjunction with the Biometals Calcium, Iron and Aluminium. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *69*, 181–191.

Picchi, A.; Gao, X.; Belmadani, S.; Potter, B. J.; Focardi, M.; Chilian, W. M.; Zhang, C. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Endothelial Dysfunction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 69–77.

Pierlovisi, C. L' Homme et La Spiruline, Un Avenir Commun ? (composition Chimique, Intérêts Alimentaires et Activités Biologiques), **2007**.

Popplewell, J. .; King, S. .; Day, J. .; Ackrill, P.; Fifield, L. .; Cresswell, R. .; di Tada, M. .; Liu, K. Kinetics of Uptake and Elimination of Silicic Acid by a Human Subject: A Novel Application of 32Si and Accelerator Mass Spectrometry. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *69*, 177–180.

Praillet, C.; Grimaud, J.; Lortat-jacob, H. Les Protéoglycanes I. Molécules Aux Multiples Fonctions... Futures Molécules Thérapeutiques? *Médecine/Sciences* **1998**, *14*, 412–420.

Prescha, A.; Zabłocka-Słowińska, K.; Hojka, A.; Grajeta, H. Instant Food Products as a Source of Silicon. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1756–1761.

Price, C. T.; Koval, K. J.; Langford, J. R. Silicon: A Review of Its Potential Role in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, *2013*, 316783.

Prockop, D. J.; Kivirikko, K. I. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 403–434.

Puyfoulhoux, G.; Rouanet, J. M.; Besançon, P.; Baroux, B.; Baccou, J. C.; Caporiccio, B. Iron Availability from Iron-Fortified Spirulina by an in Vitro digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1625–1629.

R

Rader, D.; Hobbs, H. Disorders of Lipoprotein Metabolism. *Harrisons Princ. Intern. Med.* **2005**, *16*, 2286.

Raffetto, J. D.; Khalil, R. a. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 346–359.

Raij, L. Nitric Oxide in the Pathogenesis of Cardiac Disease. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*. **2006**, *8*, 30–39.

Rasmusen, C.; Cynober, L.; Couderc, R. Arginine et Statines : Relation Avec Le Métabolisme Du Monoxyde D'azote et Perspectives Dans Le Traitement de L'athérosclérose. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. **2005**, *63*, 443–455.

Rastogi, R. P.; Sinha, R. P.; Moh, S. H.; Lee, T. K.; Kottuparambil, S.; Kim, Y.-J.; Rhee, J.-S.; Choi, E.-M.; Brown, M. T.; Häder, D.-P.; et al. Ultraviolet Radiation and Cyanobacteria. *J. Photochem. Photobiol. B*. **2014**, *141C*, 154–169.

Ray, R.; Shah, A. M. NADPH Oxidase and Endothelial Cell Function. *Clin. Sci.* **2005**, *109*, 217–226.

Rechter, S.; König, T.; Auerochs, S.; Thulke, S.; Walter, H.; Dörnenburg, H.; Walter, C.; Marschall, M. Antiviral Activity of Arthrospira-Derived Spirulan-like Substances. *Antiviral Res.* **2006**, *72*, 197–206.

Reffitt, D. M.; Jugdaohsingh, R.; Thompson, R. P. .; Powell, J. J. Silicic Acid: Its Gastrointestinal Uptake and Urinary Excretion in Man and Effects on Aluminium Excretion. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *76*, 141–147.

Reffitt, D. M.; Ogston, N.; Jugdaohsingh, R.; Cheung, H. F. J.; Evans, B. A. J.; Thompson, R. P. H.; Powell, J. J.; Hampson, G. N. Orthosilicic Acid Stimulates Collagen Type 1 Synthesis and Osteoblastic Differentiation in Human Osteoblast-like Cells in Vitro. *Bone* **2003**, *32*, 127–135.

Refsgaard, H. H. F.; Tsai, L.; Stadtman, E. R. Modifications of Proteins by Polyunsaturated Fatty Acid Peroxidation Products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 611–616.

Rezaie, A.; Parker, R. D.; Abdollahi, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 2015–2021.

Rico, H.; Gallego-Lago, J. L.; Hernández, E. R.; Villa, L. F.; Sanchez-Atrio, A.; Seco, C.; Gérvas, J. J. Effect of Silicon Supplement on Osteopenia Induced by Ovariectomy in Rats. *Calcif. Tissue Int.* **2000**, *66*, 53–55.

Rigas, B.; Sun, Y. Induction of Oxidative Stress as a Mechanism of Action of Chemopreventive Agents against Cancer. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 1157–1160.

Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Ascherio, A.; Giovannucci, E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1450–1456.

Riou, S.; Mees, B.; Esposito, B.; Merval, R.; Vilar, J.; Stengel, D.; Ninio, E.; van Haperen, R.; de Crom, R.; Tedgui, A.; et al. High Pressure Promotes Monocyte Adhesion to the Vascular Wall. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 1226–1233.

Riss, J.; Décordé, K.; Sutra, T.; Delage, M.; Baccou, J.-C.; Jouy, N.; Brune, J.-P.; Oréal, H.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M. Phycobiliprotein C-Phycocyanin from Spirulina Platensis Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7962–7967.

Robberecht, H.; Van Cauwenbergh, R.; Van Vlaslaer, V.; Hermans, N. Dietary Silicon Intake in Belgium: Sources, Availability from Foods, and Human Serum Levels. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 4777–4782.

Robins, S.; Farquharson, C. Connective Tissue Components of Th Eblood Vessel Wall in Health and Disease. *Vasc. Pathol.* **1995**, 89–127.

Rodríguez-Sánchez, R.; Ortiz-Butrón, R.; Blas-Valdivia, V.; Hernández-García, A.; Cano-Europa, E. Phycobiliproteins or C-Phycocyanin of Arthrospira (Spirulina) Maxima Protect against HgCl(2)-Caused Oxidative Stress and Renal Damage. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2359–2365.

Romain, C.; Gaillet, S.; Carillon, J.; Vidé, J.; Ramos, J.; Izard, J.-C.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M. Vineatrol and Cardiovascular Disease: Beneficial Effects of a Vine-Shoot Phenolic Extract in a Hamster Atherosclerosis Model. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11029–11036.

Romay, C.; González, R.; Ledón, N.; Remirez, D.; Rimbau, V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4*, 207–216.

Rondeau, V.; Commenges, D.; Jacqmin-Gadda, H.; Dartigues, J. F. Relation between Aluminum Concentrations in Drinking Water and Alzheimer's Disease: An 8-Year Follow-up Study. *Am. J. Epidemiol.* **2000**, *152*, 59–66.

Ross, E.; Dominy, W. The Nutritional Value of Dehydrated, Blue-Green Algae (Spirulina Platensis) for Poultry. *Poult. Sci.* **1990**, *69*, 794–800.

Ross, R. The Pathogenesis of Atherosclerosis : A Perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, *362*, 801–809.

Ross, R. Atherosclerosis--an Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115–126.

Ross, R.; Harker, L. Hyperlipidemia and Atherosclerosis. *Science (80-.).* **1976**, *193*, 1094–1100.

Rothblat, G. H.; Phillips, M. C. High-Density Lipoprotein Heterogeneity and Function in Reverse Cholesterol Transport. *Curr. Opin. Lipidol.* **2011**, *21*, 229–238.

Rubanyi, G. M.; Vanhoutte, P. M. Superoxide Anions and Hyperoxia Inactivate Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Am. J. Physiol.* **1986**, *250*, H822–H827.

Rudijanto, A. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells on the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Acta Medica Indones.* **2007**, *39*, 86–93.

S

Salazar, M.; Martinez, E.; Madrigal, E.; Ruiz, L. E.; Chamorro, G. A. Subchronic Toxicity Study in Mice Fed Spirulina Maxima. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *62*, 235–241.

Schönbeck, U.; Mach, F.; Sukhova, G. K.; Herman, M.; Graber, P.; Kehry, M. R.; Libby, P. CD40 Ligation Induces Tissue Factor Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 7–14.

Schönherr, E.; Hausser, H.; Beavan, L.; Kresse, H. Decorin-Type I Collagen Interaction. Presence of Separate Core Protein-Binding Domains. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 8877–8883.

Schrijvers, D. M.; De Meyer, G. R. Y.; Herman, A. G.; Martinet, W. Phagocytosis in Atherosclerosis: Molecular Mechanisms and Implications for Plaque Progression and Stability. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *73*, 470–480.

Schwartz, S.; DeBlois, D.; O'Brien, E. The Intima. Soil for Atherosclerosis and Restenosis. *Circ. Res.* **1995**, *77*, 445–465.

Schwarz, K. A Bound Form of Silicon in Glycosaminoglycans and Polyuronides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 1608–1612.

Schwarz, K.; Ricci, B. A.; Punsar, S.; Karvonen, M. J. Inverse Relation of Silicon in Drinking Water and Atherosclerosis in Finland. *Lancet* **1977**, *1*, 538–539.

Seaborn, C. D.; Nielsen, F. H. Silicon: A Nutritional Beneficence for Bones, Brains and Blood Vessels? *Nutr. Today* **1993**, *28*, 13–18.

Seaborn, C. D.; Nielsen, F. H. Silicon Deprivation and Arginine and Cystine Supplementation Affect Bone Collagen and Bone and Plasma Trace Mineral Concentrations in Rats. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **2002**, *15*, 113–122.

Seaborn, C. D.; Briske-Anderson, M.; Nielsen, F. H. An Interaction between Dietary Silicon and Arginine Affects Immune Function Indicated by Con-A-Induced DNA Synthesis of Rat Splenic T-Lymphocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* **2002**, *87*, 133–142.

Seimon, T.; Tabas, I. Mechanisms and Consequences of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, S382–S387.

Selzman, C. H.; Miller, S. A.; Zimmerman, M. A.; Gamboni-Robertson, F.; Harken, A. H.; Banerjee, A. Monocyte Chemotactic Protein-1 Directly Induces Human Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, 1455–1461.

Sena, L. a; Chandel, N. S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 158–167.

Serpeloni, J. M.; Grotto, D.; Aissa, A. F.; Mercadante, A. Z.; Bianchi, M. de L. P.; Antunes, L. M. G. An Evaluation, Using the Comet Assay and the Micronucleus Test, of the Antigenotoxic Effects of Chlorophyll B in Mice. *Mutat. Res.* **2011**, *725*, 50–56.

Seshadri, S.; Beiser, A.; Pikula, A.; Himali, J. J.; Kelly-Hayes, M.; Debette, S.; DeStefano, A. L.; Romero, J. R.; Kase, C. S.; Wolf, P. a. Parental Occurrence of Stroke and Risk of Stroke in Their Children: The Framingham Study. *Circulation* **2010**, *121*, 1304–1312.

Sesso, H. D.; Buring, J. E.; Christen, W. G.; Kurth, T.; Belanger, C.; MacFadyen, J.; Bubes, V.; Manson, J. E.; Glynn, R. J.; Gaziano, J. M. Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men: The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial. *JAMA* **2008**, *300*, 2123–2133.

Shah, P. K. Molecular Mechanisms of Plaque Instability. *Curr. Opin. Lipidol.* **2007**, *18*, 492–499.

Shah, P. K.; Nilsson, J.; Kaul, S.; Fishbein, M. C.; Ageland, H.; Hamsten, A.; Johansson, J. Effects of Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Aortic Atherosclerosis in Apolipoprotein E – Deficient Mice. *Circulation* **1998**, 780–785.

Shah, P. K.; Yano, J.; Reyes, O.; Chyu, K.; Kaul, S.; Bisgaier, C. L.; Drake, S.; Cercek, B. High-Dose Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E–Deficient Mice Potential. *Circulation* **2001**, *103*, 3047–3051.

Shah, Z. A.; Li, R.; Ahmad, A. S.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M.; Biswal, S.; Doré, S. The Flavanol (-)-Epicatechin Prevents Stroke Damage through the Nrf2/HO1 Pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 1951–1961.

Sharrett, A. R.; Ballantyne, C. M.; Coady, S. A.; Heiss, G.; Sorlie, P. D.; Catellier, D.; Patsch, W. Coronary Heart Disease Prediction From Lipoprotein Cholesterol Levels, Triglycerides, Lipoprotein(a), Apolipoproteins A-I and B, and HDL Density Subfractions. *Circulation* **2001**, *104*, 1108–1114.

Shaul, P. W. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Location, Location, Location. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64*, 749–774.

Shi, F.; Qin, S.; Wang, Y.-C. The Coevolution of Phycobilisomes: Molecular Structure Adapting to Functional Evolution. *Comp. Funct. Genomics* **2011**, *2011*, 230236.

Shi, W.; Haberland, M. E.; Jien, M.-L.; Shih, D. M.; Lusis, a. J. Endothelial Responses to Oxidized Lipoproteins Determine Genetic Susceptibility to Atherosclerosis in Mice. *Circulation* **2000**, *102*, 75–81.

Shih, C.; Cheng, S.; Wong, C.; Kuo, Y.; Chou, T. Antiinflammatory and Antihyperalgesic Activity of C-Phycocyanin. *Anesth. Analg.* **2009**, *108*, 1303–1310.

Sies, H.; Jones, D. *Encyclopedia of Stress*; Elsevier, **2007**; pp. 45–48.

Simm, A.; Campisi, J. Stress and Aging. *Exp. Gerontol.* **2014**, *59*, 1–2.

Simonich, M. T.; McQuistan, T.; Jubert, C.; Pereira, C.; Hendricks, J. D.; Schimerlik, M.; Zhu, B.; Dashwood, R. H.; Williams, D. E.; Bailey, G. S. Low-Dose Dietary Chlorophyll Inhibits Multi-Organ Carcinogenesis in the Rainbow Trout. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1014–1024.

Singhal, A. K.; Finver-Sadowsky, J.; McSherry, C. K.; Mosbach, E. H. Effect of Cholesterol and Bile Acids on the Regulation of Cholesterol Metabolism in Hamster. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1983**, *752*, 214–222.

Siri-Tarino, P. W.; Sun, Q.; Hu, F. B.; Krauss, R. M. Saturated Fat, Carbohydrate, and Cardiovascular Disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 502–509.

Skuland, T.; Ovrevik, J.; Låg, M.; Schwarze, P.; Refsnes, M. Silica Nanoparticles Induce Cytokine Responses in Lung Epithelial Cells through Activation of a p38/TACE/TGF-α/EGFR-Pathway and NF-κB Signalling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *279*, 76–86.

Smith, B. W.; Adams, L. A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2011**, *48*, 97–113.

Smith, J. D.; Trogan, E.; Ginsberg, M.; Grigaux, C.; Tian, J.; Miyata, M. Decreased Atherosclerosis in Mice Deficient in Both Macrophage Colony-Stimulating Factor (op) and Apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 8264–8268.

Soran, H.; Hama, S.; Yadav, R.; Durrington, P. N. HDL Functionality. *Curr. Opin. Lipidol.* **2012**, *23*, 353–366.

Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; LLeonart, M. E. Oxidative Stress and Cancer: An Overview. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 376–390.

Spady, D. K.; Dietschy, J. M. Sterol Synthesis in Vivo in 18 Tissues of the Squirrel Monkey, Guinea Pig, Rabbit, Hamster, and Rat. *J. Lipid Res.* **1983**, *24*, 303–315.

Spady, D. K.; Dietschy, J. M. Dietary Saturated Triacylglycerols Suppress Hepatic Low Density Lipoprotein Receptor Activity in the Hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 4526–4530.

Spady, D. K.; Dietschy, J. M. Interaction of Dietary Cholesterol and Triglycerides in the Regulation of Hepatic Low Density Lipoprotein Transport in the Hamster. *J. Clin. Invest.* **1988**, *81*, 300–309.

Spady, D. K.; Stange, E. F.; Bilhartz, L. E.; Dietschy, J. M. Bile Acids Regulate Hepatic Low Density Lipoprotein Receptor Activity in the Hamster by Altering Cholesterol Flux across the Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986a**, *83*, 1916–1920.

Spady, D. K.; Meddings, J. B.; Dietschy, J. M. Kinetic Constants for Receptor-Dependent and Receptor-Independent Low Density Lipoprotein Transport in the Tissues of the Rat and Hamster. *J. Clin. Invest.* **1986b**, *77*, 1474–1481.

Spector, T. D.; Calomme, M. R.; Anderson, S. H.; Clement, G.; Bevan, L.; Demeester, N.; Swaminathan, R.; Jugdaohsingh, R.; Berghe, D. A. Vanden; Powell, J. J. Choline-Stabilized Orthosilicic Acid Supplementation as an Adjunct to Calcium/vitamin D3 Stimulates Markers of Bone Formation in Osteopenic Females: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2008**, *9*, 85.

Spinetti, G.; Wang, M.; Monticone, R.; Zhang, J.; Zhao, D.; Lakatta, E. G. Rat Aortic MCP-1 and Its Receptor CCR2 Increase with Age and Alter Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 1397–1402.

Spiteller, G. The Important Role of Lipid Peroxidation Processes in Aging and Age Dependent Diseases. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 5–12.

Sripanyakorn, S.; Jugdaohsingh, R.; Thompson, R. P. H.; Powell, J. J. Dietary Silicon and Bone Health. *Nutr. Bull.* **2005**, *30*, 222–230.

Sripanyakorn, S.; Jugdaohsingh, R.; Dissayabutr, W.; Anderson, S. H. C.; Thompson, R. P. H.; Powell, J. J. The Comparative Absorption of Silicon from Different Foods and Food Supplements. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 825–834.

Stamler, J.; Wentworth, D.; Neaton, J. D. The Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)—Importance Then and Now. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2008**, *300*, 1343–1345.

Stampfer, M. J.; Hennekens, C. H.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Willett, W. C. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Disease in Women. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1444–1449.

Stary, H. C.; Chandler, a. B.; Glagov, S.; Guyton, J. R.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schaffer, S. a.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W. A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1994**, *14*, 840–856.

Stary, H. C.; Chandler, A. B.; Dinsmore, R. E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **1995**, *92*, 1355–1374.

Stegemann, J. P.; Hong, H.; Nerem, R. M. Mechanical, Biochemical, and Extracellular Matrix Effects on Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 2321–2327.

Stiko-rahm, A.; Hultgsrdh-nilsson, A.; Regnstrom, J.; Hamsten, A.; Nilsson, J. Native and Oxidized LDL Enhances Production of PDGF AA and the Surface Expression of PDGF Receptors in Cultured Human Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb.* **1992**, *12*, 1099–1109.

Stocker, R.; Keaney, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1381–1478.

Sugamura, K.; Keaney, J. F. Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 978–992.

Suh, J.-H.; Romain, C.; González-Barrio, R.; Cristol, J.-P.; Teissèdre, P.-L.; Crozier, A.; Rouanet, J.-M. Raspberry Juice Consumption, Oxidative Stress and Reduction of Atherosclerosis Risk Factors in Hypercholesterolemic Golden Syrian Hamsters. *Food Funct.* **2011**, *2*, 400–405.

Sun, N.; Wood, N. B.; Hughes, A. D.; Thom, S. a M.; Yun Xu, X. Effects of Transmural Pressure and Wall Shear Stress on LDL Accumulation in the Arterial Wall: A Numerical Study Using a Multilayered Model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H3148–H3157.

Sunderman, F. W.; Marzouk, A.; Hopfer, S. M.; Zaharia, O.; Reid, M. C. Increased Lipid Peroxidation in Tissues of Nickel Chloride-Treated Rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1985**, *15*, 229–236.

Sutra, T.; Décordé, K.; Riss, J.; Dallas, C.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M. A Commercial Extract of Fruits and Vegetables, Oxxynea, Acts as a Powerful Antiatherosclerotic Supplement in an Animal Model by Reducing Cholesterolemia, Oxidative Stress, and NADPH Oxidase Expression. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4258–4263.

T

Tabas, I. Macrophage Death and Defective Inflammation Resolution in Atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 36–46.

Taddei, S.; Ghiadoni, L.; Virdis, A.; Versari, D.; Salvetti, A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2385–2402.

Tamagnini, P.; Leitão, E.; Oliveira, P.; Ferreira, D.; Pinto, F.; Harris, D. J.; Heidorn, T.; Lindblad, P. Cyanobacterial Hydrogenases: Diversity, Regulation and Applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 692–720.

Tamminen, M.; Mottino, G.; Qiao, J. H.; Breslow, J. L.; Frank, J. S. Ultrastructure of Early Lipid Accumulation in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 847–853.

Targher, G.; Arcaro, G. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Increased Risk of Cardiovascular Disease. *Atherosclerosis* **2007**, *191*, 235–240.

Teas, J.; Irhimeh, M. R. Dietary Algae and HIV / AIDS : Proof of Concept Clinical Data. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 575–582.

Thiel, G.; Geisler, G.; Blechschmidt, I.; Danzer, K. Determination of Trace Elements in Wines and Classification according to Their Provenance. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1630–1636.

Thim, T.; Hagensen, M. K.; Bentzon, J. F.; Falk, E. From Vulnerable Plaque to Atherothrombosis. *J. Intern. Med.* **2008**, *263*, 506–516.

Tian, L.; Luo, N.; Zhu, X.; Chung, B.-H.; Garvey, W. T.; Fu, Y. Adiponectin-AdipoR1/2-APPL1 Signaling Axis Suppresses Human Foam Cell Formation: Differential Ability of AdipoR1 and AdipoR2 to Regulate Inflammatory Cytokine Responses. *Atherosclerosis* **2012**, *221*, 66–75.

Touyz, R. M.; Yao, G.; Schiffrin, E. L. C-Src Induces Phosphorylation and Translocation of p47phox: Role in Superoxide Generation by Angiotensin II in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 981–987.

Trinder, P. Determination of Blood Glucose Using 4-Amino Phenazone as Oxygen Acceptor. *J. Clin. Pathol.* **1969**, *22*, 246–246.

Trumbo, P.; Yates, A. A.; Schlicker, S.; Poos, M. Dietary Reference Intakes: Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* **2001**, *101*, 294–301.

Tsukano, H.; Gotoh, T.; Endo, M.; Miyata, K.; Tazume, H.; Kadomatsu, T.; Yano, M.; Iwawaki, T.; Kohno, K.; Araki, K.; et al. The Endoplasmic Reticulum Stress-C/EBP Homologous Protein Pathway-Mediated Apoptosis in Macrophages Contributes to the Instability of Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1925–1932.

Tucker, K. L.; Jugdaohsingh, R.; Powell, J. J.; Qiao, N.; Hannan, M. T.; Sripanyakorn, S.; Cupples, L. A.; Kiel, D. P. Effects of Beer, Wine, and Liquor Intakes on Bone Mineral Density in Older Men and Women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1188–1196.

Tunstall-pedoe, H.; Kuulasmaa, K.; Mahonen, M.; Totonen, H.; Ruokokoski, E.; Amouyel, P. Contribution of Trends in Survival and Coronary-Event Rates to Changes in Coronary Heart Disease Mortality : 10-Year Results from 37 WHO MONICA Project Populations. *Lancet* **1999**, *353*, 1547–1557.

V

Vaishampayan, A.; Sinha, R.; Hader, D.; Dey, T.; Gupta, A. K.; Bhan, U.; Rao, A. L. Cyanobacterial Biofertilizers in Rice Agriculture. *Bot. Rev.* **2001**, *67*, 453–516.

Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161–1208.

Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40.

Vanhoutte, P. M. Endothelial Control of Vasomotor Function: From Health to Coronary Disease. *Circ. J.* **2003**, *67*, 572–575.

Varo, P.; Koivistoinen, P. Mineral Element Composition of Finnish Foods. *Acta Agric Scand Suppl* **1980**, *22*, 165–171.

Veeramachaneni, S.; Wang, X.-D. Carotenoids and Lung Cancer Prevention. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **2009**, *1*, 258–274.

Videla, L. a; Tapia, G.; Rodrigo, R.; Pettinelli, P.; Haim, D.; Santibañez, C.; Araya, a V.; Smok, G.; Csendes, A.; Gutierrez, L.; et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA Binding in Obese Patients. *Obesity* **2009**, *17*, 973–979.

Vincent, M. A.; Montagnani, M.; Quon, M. J. Molecular and Physiologic Actions of Insulin Related to Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelium. *Curr. Diab. Rep.* **2003**, *3*, 279–288.

Vítek, L.; Jirsa, M.; Brodanová, M.; Kaláb, M.; Mareček, Z.; Danzig, V.; Novotný, L.; Kotal, P. Gilbert Syndrome and Ischemic Heart Disease: A Protective Effect of Elevated Bilirubin Levels. *Atherosclerosis* **2002**, *160*, 449–456.

W

Wachter, H.; Lechleitner, M.; Artner-Dworzak, E.; Hausen, A.; Jarosch, E.; Widner, B.; Patsch, J.; Pfeiffer, K.; Fuchs, D. Diatomaceous Earth Lowers Blood Cholesterol Concentrations. *Eur. J. Med. Res.* **1998**, *3*, 211–215.

Wang, X.; Wang, W.; Li, L.; Perry, G.; Lee, H.; Zhu, X. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1240–1247.

Wannamethee, S. G.; Tchernova, J.; Whincup, P.; Lowe, G. D. O.; Kelly, A.; Rumley, A.; Wallace, a M.; Sattar, N. Plasma Leptin: Associations with Metabolic, Inflammatory and Haemostatic Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Atherosclerosis* **2007**, *191*, 418–426.

Wassmann, S.; Wassmann, K.; Nickenig, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension* **2004**, *44*, 381–386.

Watanabe, F. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **2007**, *232*, 1266–1274.

Wei, Y.; Rector, R.; Thyfault, J. P.; Ibdah, J. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mitochondrial Dysfunction. *World J. Gastroentrology* **2008**, *14*, 193–199.

Weisiger, R. A.; Fridovich, I. Mitochondrial Superoxide Simutase. Site of Synthesis and Intramitochondrial Localization. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4793–4796.

Wheatcroft, S. B.; Williams, I. L.; Shah, A. M.; Kearney, M. T. Pathophysiological Implications of Insulin Resistance on Vascular Endothelial Function. *Diabet. Med.* **2003**, *20*, 255–268.

Wheeler, D. L.; Chappey, C.; Lash, A. E.; Leipe, D. D.; Madden, T. L.; Schuler, G. D.; Tatusova, T. A.; Rapp, B. A. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 10–14.

Whitton, B. A.; Potts, M. The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space. In *Kluwer Academic Publishers*; Dordrecht, **2000**; p. 669.

Widner, B.; Mirlach, A.; Hausen, A.; Jenewein, I.; Jenewein, D.; Dierich, M. P.; Wachter, H.; Fuchs, D. Determination of Silicon in Urine by Inductive Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy. *Clin. Chim. Acta* **1998**, *277*, 51–63.

Wigren, M.; Nilsson, J.; Kolbus, D. Lymphocytes in Atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* **2012**, *413*, 1562–1568.

De Winther, M. P.; Gijbels, M. J.; Van Dijk, K. W.; Havekes, L. M.; Hofker, M. H. Transgenic Mouse Models to Study the Role of the Macrophage Scavenger Receptor Class A in Atherosclerosis. *Int. J. Tissue React.* **2000**, *22*, 85–91.

Wu, L.-C.; Ho, J.-A. A. Antioxydative and Hepatoprotective Effects of Spirulina. In *Spirulina in Human Nutrition and Health*; Gershwin; Belay, A., Eds.; **2007**.

X

Xu, A.; Wang, Y.; Keshaw, H.; Xu, L. Y.; Lam, K. S. L.; Cooper, G. J. S. The Fat-Derived Hormone Adiponectin Alleviates Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Diseases in Mice. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 91–100.

Xu, C. X.; Ma, Y. P.; Liu, Y. L. Effects of Silicon (Si) on Growth, Quality and Ionic Homeostasis of Aloe under Salt Stress. *South African J. Bot.* **2015**, *98*, 26–36.

Xue, C.; Hu, Y.; Saito, H.; Zhang, Z.; Li, Z.; Cai, Y.; Ou, C.; Lin, H.; Imbs, A. B. Molecular Species Composition of Glycolipids from Sprirulina Platensis. *Food Chem.* **2002**, *77*, 9–13.

Y

Yamagishi, S. I.; Edelstein, D.; Du, X. L.; Kaneda, Y.; Guzmán, M.; Brownlee, M. Leptin Induces Mitochondrial Superoxide Production and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Aortic Endothelial Cells by Increasing Fatty Acid Oxidation via Protein Kinase A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25096–25100.

Yamaguchi, M. Role of Carotenoid B-Cryptoxanthin in Bone Homeostasis. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 36.

Yamaguchi, N.; Argueta, J. G. M.; Masuhiro, Y.; Kagishita, M.; Nonaka, K.; Saito, T.; Hanazawa, S.; Yamashita, Y. Adiponectin Inhibits Toll-like Receptor Family-Induced Signaling. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6821–6826.

Yamamoto, C.; Nakamura, A.; Shimada, S.; Kaji, T.; Lee, J.-B.; Hayashi, T. Differential Effects of Sodium Spirulan on the Secretion of Fibrinolytic Proteins from Vascular Endothelial Cells: Enhancement of Plasminogen Activator Activity. *J. Heal. Sci.* **2003**, *49*, 405–409.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; et al. Adiponectin Stimulates Glucose Utilization and Fatty-Acid Oxidation by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1288–1295.

Yang, Y.; Park, Y.; Cassada, D. A.; Snow, D. D.; Rogers, D. G.; Lee, J. In Vitro and in Vivo Safety Assessment of Edible Blue-Green Algae, Nostoc Commune Var. Sphaeroides Kützing and Spirulina Plantensis. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1560–1564.

Yang, Y.; Kim, B.; Park, Y.-K.; Lee, J.-Y. Effects of Long-Term Supplementation of Blue-Green Algae on Lipid Metabolism in C57BL/6J Mice. *J. Nutr. Heal. food Sci.* **2014**, *1*, 1–14.

Yates, A. A. National Nutrition and Public Health Policies: Issues Related to Bioavailability of Nutrients When Developing Dietary Reference Intakes. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1331S – 4S.

Yerneni, K. K.; Bai, W.; Khan, B. V.; Medford, R. M.; Natarajan, R. Hyperglycemia-Induced Activation of Nuclear Transcription Factor kappaB in Vascular Smooth Muscle Cells. *Diabetes* **1999**, *48*, 855–864.

Young, R. W.; Beregi, J. S. Use of Chlorophyllin in the Care of Geriatric Patients. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1980**, *28*, 46–47.

Z

Zhang, H.; Chen, T.; Jiang, J.; Wong, Y.; Yang, F.; Zheng, W. Selenium-Containing Allophycocyanin Purified from Selenium-Enriched Spirulina Platensis Attenuates AAPH-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes through Inhibition of ROS Generation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue. *Nature* **1994**, *372*, 425–432.

Zhao, L.; Funk, C. D. Lipoxygenase Pathways in Atherogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **2004**, *14*, 191–195.

Zhou, X.; Nicoletti, A.; Elhage, R.; Hansson, G. K. Transfer of CD4(+) T Cells Aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice. *Circulation* **2000**, *102*, 2919–2922.

Zielecka, M. Silicon–universal Element. In *Part II. Wiad. Ziel*; **1996**; pp. 6–7.

Résumé

En raison de ses formes peu biodisponibles retrouvées dans la nature, le silicium n'a reçu que très peu d'intérêt dans le domaine biologique. Or, il est clairement démontré que le silicium peut avoir un rôle important dans la prévention de l'athérosclérose.

L'entreprise Phyco-Biotech, productrice de spiruline, s'est intéressée à ce problème. Les propriétés nutritionnelles exceptionnelles de la spiruline, ainsi que ses effets bénéfiques sur certaines pathologies ne sont plus à démontrer. Grâce à un procédé breveté, Phyco-Biotech a réussi à produire une spiruline enrichie en silicium, permettant au silicium d'avoir certainement une meilleure biodisponibilité chez l'homme.

L'objectif de ce travail a été d'étudier les effets d'une supplémentation en spiruline enrichie en silicium, en mode préventif, sur un modèle animal d'athérosclérose nutritionnellement induite.

Dans une étude de toxicologie chez le rat, constituant la première partie de ce travail, nous avons montré que la spiruline enrichie en silicium n'est pas toxique à la dose utilisée.

Dans la seconde partie, nous avons mis en évidence un effet préventif de la spiruline enrichie en silicium sur les multiples composantes de la pathologie athéromateuse et sur les désordres nutritionnels liés à la consommation d'un régime riche en graisses saturées.

A la suite de ce travail, nous avons proposé des hypothèses de mécanismes d'action. Ces mécanismes pourraient impliquer une modulation de la voie NF-κB ; ou bien agir sur le remodelage artériel et notamment sur les processus cellulaires impliqués dans les propriétés contractiles de l'artère. La compréhension totale du mécanisme d'action de cette spiruline enrichie en silicium nécessite cependant plus d'investigations.

Abstract

Due to low bioavailability forms of silicon found in the nature, it has received little interest in the biological field. However, it was clearly demonstrated that silicon may have an important role in prevention of atherosclerosis.

The company Phyco-Biotech, spirulina producer, was interested in this problem. The exceptional nutritional properties of spirulina and its beneficial effects on some diseases are well established. Through a patented process, Phyco-Biotech has successfully produced silicon enriched spirulina, allowing the silicon to have a better bioavailability in humans.

The objective of this work was to study the effects of a supplementation with silicon enriched spirulina, in an animal model of nutritionally induced atherosclerosis.

The first part of this study has shown, using a study in rats, that silicon enriched spirulina was not toxic at the dose used.

In the second part, silicon enriched spirulina has shown a preventive effect on risk factors for atherosclerotic disease and disorders related to the consumption of a high fat diet.

This work allowed to propose hypothesis of mechanisms of action. Indeed, these mechanisms could involve modulation of the NF-kB pathway, or act on the arterial remodeling or on cellular pathways involved in the contractile properties of the artery. More investigations are needed to determine the complete mechanism of action of this silicon enriched spirulina.

Keywords : silicon enriched spirulina, atherosclerosis, oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction, Syrian golden hamster.

Laboratoire

Nutrition & Métabolisme, UMR 204 NUTRIPASS - Prévention des Malnutritions et des Pathologies Associées, Université Montpellier 2, Montpellier, France.