



HAL
open science

Effets athéroprotecteurs de la curcumine et d'extraits riches en polyphénols d'*Antirhea borbonica* et de *Doratoxylon apetalum*

Jonathan Bonneville

► **To cite this version:**

Jonathan Bonneville. Effets athéroprotecteurs de la curcumine et d'extraits riches en polyphénols d'*Antirhea borbonica* et de *Doratoxylon apetalum*. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Réunion, 2018. Français. NNT : 2018LARE0013 . tel-01940081

HAL Id: tel-01940081

<https://theses.hal.science/tel-01940081>

Submitted on 30 Nov 2018

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.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION
UFR SANTÉ

Thèse

Présenté pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN BIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Par *jonathan BONNEVILLE*

**Effets athéroprotecteurs de la curcumine et
d'extraits riches en polyphénols d'*Antirhea
borbonica* et de *Doratoxylon apetalum*.**

Soutenue le 27 / Juin / 2018 devant la commission d'examen :

- HO-TIN-NOE Benoit (HDR) Laboratory for Vascular Translational Science - rapporteur -
- PINET Florence (HDR) INSERM U1157 - rapporteur -
- MEILHAC Olivier (DR) INSERM U1188 - Directeur de Thèse -
- VINDIS Cécile (DR) INSERM U1048 -Co-Directrice de Thèse -
- DEVIN Anne (DR CNRS) UMR5095 - Examinatrice -
- BOURDON Emmanuel (PU) INSERM U1188 - Examineur -



Citations :

**« Do not go gentle into that good night,
old age should burn and rave at close of day ;
Rage, rage against the dying of the light. »**

Extrait d'un poème de Dylan Thomas, 1951.

**« On ne naît pas Homme, on le
devient »**

Erasme, de pueris instituendis 1519

**« Tout obstacle renforce la détermination. Celui
qui s'est fixé un but n'en change pas. »**

Léonard De Vinci

« awhhh noooo, nooo, awh nooo.. »

The walking dead s3ep4

Remerciements :

Je voudrais remercier tous les membres de l'équipe 10 de l'I2MC,

Tout d'abord Mme Nègre-Salvayre et Mr Salvayre, pour votre accueil chaleureux et vos travaux scientifiques d'exception. Vous croiser au quotidien fut délicieux, tout autant que lire les excellents review scientifiques que vous avez publiés. Votre ne serez pas oubliés.

Je voudrais remercier Mme Cécile VINDIS, ma co-directrice de thèse, Pour les techniques qu'elle m'a apprises, notamment sur l'oxydation des LDL et les techniques de western blot.

Merci à l'ingénieur Julien FACCINI, pour toutes les techniques que il m'a apprises. Je suis désolé que tu n'aies pas pu venir à mon pot de départ. (PS : je n'oublierai jamais ta technique de tourner les capuchons, elle m'a suivi tout le long de ma thèse et elle continuera de me suivre.)

Et merci aussi à l'ingénieur Audrey SWIADER, pour sa patience, et toute les techniques qu'elle m'a apprises. J'aurais aimé travailler avec toi dans d'autres conditions, je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite.

Je voudrais remercier les ingénieurs Corinne BERNIS, et Myriam ROUABI pour les coups de main occasionnels et pour avoir mis à disposition les LDL, j'espère que tout va bien pour vous là-bas, à Toulouse.

Je voudrais aussi remercier particulièrement Mme Natalie AUGÉ, pour sa rigueur et sa personnalité agréable. Votre esprit et votre autorité tranquille ont su facilement forcer mon respect et mon admiration. Je vous remercie pour tout le temps passé ensemble et les techniques que vous m'avez apprises, je vous souhaite sincèrement le meilleur.

Enfin, merci beaucoup à Christophe SANTIAGO et tous les autres de l'équipe pour la bonne humeur et la chaleur humaine que vous m'avez fournies. Ça a été très important pour moi.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de l'unité DÉTROI. ,

En particulier le Dr Olivier MEILHAC, Mon directeur de thèse qui m'a accueilli au sein de son unité et encadré durant mon doctorat. Merci pour ta rigueur scientifique implacable qui m'a permis de repousser mes limites et pour ta tolérance et ton amabilité qui m'ont permis d'évoluer sereinement pendant ces années de thèse. Tu m'as dit un jour avoir du mal à me cerner, et je t'avoue que le sentiment est réciproque, mais je pense aussi qu'il n'est pas nécessaire de cerner l'autre pour l'apprécier.

Je voudrais aussi remercier Christine ROBERT DA-SILVA et le Mr Emmanuel BOURDON pour m'avoir conseillé et aidé sur les essais sur les souris ApoE ko, mais aussi pour leur présence agréable au quotidien. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé, et pour les techniques que vous m'avez apprises.

Merci aussi à Nicolas DIOTEL pour tes conseils en histologie, et pour la confiance que tu m'as accordé en me confiant une fraction de ta charge d'enseignement.

Un (très) grand merci aussi aux ingénieurs Philippe RONDEAU, Jessica PATCHE et Pierre GIRAUD, pour avoir été de vraies boussoles pendant mon doctorat. Vous m'avez conseillé et aidé avec patience et amabilité, sans vous j'aurais été complètement perdu. Je vous remercie sincèrement pour tout.

Je voudrais ensuite remercier mes amis doctorants, vous étiez tous géniaux !

Merci à Angélique ARCAMBAL et Anne-Claire DORSEMANS pour nos séances de thé scientifique et philosophique. J'aurais aimé pouvoir réunir tous les doctorants mais malheureusement c'est difficile de trouver un timing qui conviendrait à tout le monde. Peut-être, au fil du temps, on se retrouvera tous au TSU café de Anne-Claire et on dégustera d'agréables pâtisseries loin du chaos de la politique.

Merci à Florian GUIBBAL, Imade AIT ARSA, Johan CRETIAUX et Sébastien BÉNARD pour m'avoir intégré dès mon arrivée, à un moment de ma vie où les choses étaient difficiles, merci pour votre bonne humeur, votre camaraderie et votre franchise. J'ai passé des supers moments avec vous au labo mais aussi au dehors, et vous avez toujours été là pour me conseiller et me reconforter quand la morosité me gagnait.

Merci aussi à Aurélie CATAN, Anthony DOBI, Jennifer BARAKA-VIDOT, Latufa YOUSOUF et Angélique GAJAHl pour avoir été si gentille, de vrais amours au quotidien. Merci pour tous vos conseils, coups de main, et discussions passionnantes, vous allez vraiment me manquer !

Enfin, merci à tout le personnel de la plateforme et les amis des autres laboratoires, vous êtes trop nombreux pour que je vous remercie tous séparément mais je n'en pense pas moins. Grâce à vous j'ai passé un moment agréable durant ma thèse au CYROI et, bien que j'ai vécu durant ces années des choses difficiles tant sur le plan scientifique que personnel, vous m'avez tous ensemble permis de garder le sourire et d'aller de l'avant. Merci à vous tous.

Merci aussi à tous mes amis, tous ceux qui m'ont fait grandir et aimer durant ses longues études, vous avez toujours été là pour moi et je serai toujours là pour vous.

Merci aussi à la région réunion qui à financé cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, qui m'ont éduqué avec patiences et m'ont transmis les valeurs que je chéris. Vous m'avez enseigné la patience, la persévérance, la liberté d'opinion et le respect des autres. Vous m'avez appris à me battre pour mes convictions et à protéger les plus faibles et m'avez donné la chance de choisir ma place dans ce monde. Je suis né chanceux et je vous aime.

Merci à toi mon frère, compagnon des premières heures et soutien indéfectible, nous continuerons à vivre et à rêver ensemble jusqu'à la fin, je compte sur toi et je t'aime.

Et pour finir, un grand merci à mes grands-parents, qui m'ont chéri et appris tellement de choses. Je vous dois mon goût pour la lecture, et tous ces merveilleux voyages. Grâce à vous j'ai vécu mille vies, et voyagé aussi loin que la pensée le peut. J'aurais voulu que rien ne change, j'aurais voulu continuer à apprendre, à voir plus loin, à ressentir toujours plus et échanger tout ça avec vous. Mais le temps est implacable et mamie, toi qui n'étais pas bien téméraire, tu es déjà partie en éclaireur... je vais continuer ma route et j'essaierai de tenir la promesse que je t'ai faite. Je vous aime de tout mon être.

INTRODUCTION

I°) L'athérosclérose

I,1°) Description et épidémiologie.....p1

I,2,°) Facteurs de risque modifiables et non modifiables

I,2,1°) Hypertension.....p5

1,2,2°) Diabète, obésité et dyslipidémie.....p5

I,2,3°) Variant génétiques.....p9

I,2,4°) Autre facteurs de risques.....p10

I,3°) Athérogenèse

I,3,1°) Aorte saine.....p13

I,3,2°) Métabolisme des lipides.....p17

I,3,3°) Développement séquentiel des plaques.....p24

1,3,3,1a°) L'hyperplasie intimale.....p25

1,3,3,1b°) La strie lipidique.....p25

1,3,3,2°) L'athérome.....p29

1,3,3,3°) La plaque d'athérosclérose.....p29

1,3,3,4°) Modification de l'athérome : hémorragie intraplaque.....p32

1,3,3,5°) Complication de l'athérome : formation du thrombus.....p32

1,3,3,6°) Symptômes cliniques de l'athérosclérose.....p33

I,3,4°) Acteurs vasculaires impliqués dans la pathologie.....p35

I,3,4,1°) Cellules endothéliales et dysfonction endothéliale.....p35

I,3,4,2°) Cellules spumeuses et cœur nécrotico-lipidique.....p39

I,3,4,3°) La chappe fibreuse.....	p42
-----------------------------------	-----

II°) Stress Oxydant

II,1°) Oxydation et genèse des espèces réactives de l'oxygène <i>in vivo</i>	p44
--	-----

II,2°) Oxydation des LDL.....	p45
-------------------------------	-----

II,3°) LDLox et dysfonction endothéliale.....	p48
---	-----

III°) Polyphénols

III,1°) Présentation des polyphénols :

III,1,1°) Description des polyphénols.....	p53
--	-----

III,1,2°) Présentation des différentes classes de polyphénols.....	p53
--	-----

III,1,3°) Biosynthèse des polyphénols.....	p55
--	-----

III,1,4°) Polyphénols alimentaires et maladies cardiovasculaires.....	p55
---	-----

III,2 °) Biodisponibilité des polyphénols :

III,2,1°) Première barrière : l'effet écosystème.....	p59
---	-----

III,2,2°) Deuxième barrière : transformation industrielle et naturelle.....	p59
---	-----

III,2,3°) Troisième barrière : absorption des polyphénols.....	p59
--	-----

III,2,4°) Quatrième barrière : stabilité des polyphénols.....	p60
---	-----

III,2,5°) Cinquième barrière : temps de rétention des polyphénols.....	p61
--	-----

III,2,6°) Sixième Barrière : répartition tissulaire des polyphénols.....	p61
--	-----

III,3°) Curcumine, *Antirhea borbonica* et *Doratoxylon apetalum*.

III,3,1°) Curcumine.....p62

III,3,2°) *Antirhea borbonica*.....p62

III,3,3°) *Doratoxylon apetalum*.....p65

Matériels et Méthodes.....p69

Résultats.....p80

Conclusions.....p106

INTRODUCTION

I°) L'athérosclérose

I,1°) Description et épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité mondiale, responsable de 31% des décès à l'échelle mondiale¹. La prévalence de ces pathologies dans les différents pays est très hétérogène², car de nombreux facteurs socio-économiques et culturels influencent le développement de ces maladies. Les MCV forment une famille de pathologies touchant le système cardiovasculaire, aux origines et conséquences cliniques très variées. Parmi ces pathologies, la majorité des décès sont imputables aux cardiopathies ischémiques et aux accidents vasculaires cérébraux (AVC)³ En France les cardiopathies ischémiques sont la première cause d'années de vie perdues selon le rapport du *global burden of disease (France)* de 2010⁴. Elles sont caractérisées par une insuffisance d'apport en oxygène et nutriments (ischémie) au muscle cardiaque, en raison du développement, ou de la rupture, de plaques d'athérosclérose au niveau des artères coronaires. En 2013, la cardiopathie ischémique reste la pathologie avec la mortalité la plus élevée (19 813 décès chez les hommes et 14 261 chez les femmes en 2013)⁵.

L'athérosclérose est une pathologie progressive, qui commence par l'accumulation de lipides dans la couche superficielle de la paroi des vaisseaux sanguins appelée « *intima* ». La première étape est la formation de stries jaunâtres au niveau de *l'intima* des vaisseaux sanguins, appelées stries lipidiques. Ces stries sont formées par l'accumulation de lipides dans les cellules phagocytaires dites « spumeuses ». À ce stade, la pathologie est encore réversible. Cependant ces stries peuvent évoluer en plaques d'athérome par l'accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans l'espace extracellulaire de *l'intima*. Cette accumulation, ainsi que leur stagnation dans *l'intima*, augmentent les chances qu'elles soient modifiées, ce qui leur confère de nouvelles propriétés et les rend plus toxiques pour les cellules avoisinantes. *In fine* cette accumulation conduira à la formation du cœur nécrotico-lipidique de la plaque, contenant lipides et cellules spumeuses en apoptose ou nécrose. En dehors de l'accumulation des lipides, on observe des modifications des cellules musculaires lisses (prolifération et augmentation de l'activité de synthèse) et des cellules endothéliales qui forment *l'intima* (apoptose, dysfonction endothéliale et activité pro-inflammatoire). Ces modifications conduisent à la formation d'une chape fibreuse sous les cellules endothéliales, au recrutement de leucocytes (monocytes, lymphocytes, neutrophiles) et à des dysfonctions de la compliance vasculaire locale. Enfin, différentes complications peuvent apparaître comme la formation d'hémorragies intra-plaques ou d'un caillot luminal associé à un endothélium pro-thrombogène, ou la minéralisation de la matrice extracellulaire (calcifications). On parle alors de lésions avancées d'athérosclérose.

L'augmentation de volume des plaques d'athérosclérose conduit à la sténose du vaisseau, ce qui peut provoquer certains signes cliniques : douleurs à la poitrine dues à l'ischémie chronique (angor, caractérisé par un souffle court au repos ou à l'effort), pouvant s'accompagner de fatigue chronique, rétention de liquides (congestion pulmonaire ou gonflement des chevilles) ou des signes d'anomalie cardiaque au repos (cardiomégalie, augmentation de la concentration du peptide natriurétique etc...) ⁶. En cas de rupture de l'endothélium vasculaire, la libération du contenu de la plaque (riches en facteurs prothrombotiques) dans la circulation, active la cascade de coagulation⁷ ce qui aboutit à la formation d'un caillot obstruant tout ou partie de la lumière du vaisseau. En fonction de la localisation de celui-ci, l'ischémie entraîne, par exemple, un syndrome coronaire aigu (cœur), un AVC ischémique (cerveau) ou une ischémie des membres inférieurs.

L'étymologie du mot athérosclérose vient du grec ancien ἀθήρωμα (*athêroma*) qui veut dire « bouillie » en rapport avec le cœur nécrotico-lipidique de la plaque et σκλήρωσις (*sclérosis*) qui veut dire « durcissement » lorsque la matrice extracellulaire de la plaque est minéralisée (calcification). La dénomination « athérosclérose » pour décrire la pathologie apparaît à Strasbourg en 1835 sous l'impulsion du Dr. Lobstein⁸. Quelques années plus tard, en 1858 le Dr. Rudolf Virchow, qui prône l'origine cellulaire des pathologies humaines, propose l'idée que la lésion d'athérosclérose est un processus de réaction tissulaire, plus qu'un simple dépôt de lipides. Dans le cadre de sa théorie il accordera une place prépondérante à l'inflammation dans l'évolution de la pathologie⁹. Par la suite, les recherches se concentrent sur la physiopathologie de la plaque. à partir de 1914, le Dr. Anitschkow montre l'importance du cholestérol dans le développement de la plaque, en travaillant sur un modèle de lapin soumis à un régime riche en cholestérol, il fût aussi le premier à décrire les cellules spumeuses (phagocytes remplis de lipides) retrouvées au cœur de la plaque. En 1951 les Dr. Barr, Russ et Eder découvrent que le cholestérol dans le plasma est lié à des protéines, notamment à deux types de protéines, et ils décrivent des variations dans la balance de ces deux types de lipoprotéines chez les sujets jeunes et âgés et chez les patients souffrant de MCV par rapport à des sujets sains¹⁰. Pendant ce temps, Konrad Bloch décrit une à une toutes les étapes de la voie de biosynthèse du cholestérol ce qui lui vaudra un prix Nobel en 1964. En 1973 Joe Goldstein, fait la classification génétique des protéines transporteuses de lipides dans le sang et démontre avec Motulsky que l'hypercholestérolémie familiale est responsable de mort prématurée par infarctus observée chez leurs patients¹¹. Michael Brown et Joseph Goldstein découvrent par la suite que cette pathologie est d'origine génétique et porte sur un récepteur au LDL qui , par son absence, augmente la concentration de LDL-cholestérol (LDL-C) circulant, ce qui aggrave la pathologie athérosclérotique¹².

Cette découverte de la régulation de synthèse du cholestérol leur vaudra le prix Nobel en 1985. Finalement, dans les années 1975-80 plusieurs études indépendantes montrent qu'un taux élevé

LDL-C et un taux bas de HDL-C (high-density lipoprotein-cholesterol) sont des facteurs prédictifs des MCV, ce qui conforte l'hypothèse de l'origine lipoprotéique du cholestérol retrouvé dans les plaques. En parallèle, l'idée que baisser le cholestérol chez les patients à risque serait probablement la clé pour diminuer la mortalité cardiovasculaire commençait à faire son chemin et de nombreux chercheurs et industriels ont commencé à rechercher des molécules capables de faire baisser les taux circulants de cholestérol (inhibition de sa voie de synthèse, modification de son absorption). La première molécule thérapeutique capable de réduire la mortalité cardiovasculaire provient de l'administration de hautes doses de niacine, par le Dr. Altschul en 1958¹³, capable de se lier au cholestérol et de limiter son absorption intestinale. Malheureusement, cette molécule était mal tolérée par certains patients et son efficacité assez variable selon les patients.. Avec la découverte de l'HMG-CoA réductase, enzyme nécessaire à la synthèse du cholestérol (ce qui valut un prix Nobel à Bloch en 1964), la première thérapie ciblée apparaît en 1976, avec un biochimiste japonais du nom de Akira Endo qui découvre un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase qu'il appelle compactine¹⁴. Cette découverte marque la naissance des médicaments de la classe des statines, qui représentent la classe thérapeutique la plus efficace aujourd'hui pour diminuer le taux de cholestérol circulant chez des patients à risques. On peut noter aussi que de récents progrès dans le métabolisme du cholestérol ont permis de développer de nouveaux médicaments complémentaires des statines, comme par exemple les inhibiteurs de PCSK9 (une proprotéine convertase qui a pour rôle de dégrader le récepteur au LDL dans le foie, ce qui augmente la quantité de LDL-C circulant).

Bien que les MCV soient souvent considérées comme un mal des temps modernes, on retrouve des lésions athérosclérotiques dans les momies de l'ère préindustrielle¹⁵. Pour comprendre les raisons pour lesquelles l'athérosclérose est devenue un enjeu de santé publique majeur, il faut prendre en compte plusieurs facteurs (**tableau 1**).

En France, les progrès de dépistage et de prise en charge des MCV ont permis une diminution drastique des MCV au cours de la dernière décade ¹⁶.. Sur l'île de la Réunion où j'ai effectué ma thèse, la surmortalité régionale est 1,5 fois supérieure à celle de la métropole (sur la période 2003-2005)¹⁷ ce qui pourrait s'expliquer par la prévalence importante du diabète de type II (11,2%) par rapport à la métropole (2,9%) en 2005^{18,19}. Au vu de l'état des connaissances actuelles de la pathologie, il conviendrait s'agir sur plusieurs plans afin de réduire l'incidence des MCV : premièrement intensifier les campagnes de prévention pour diminuer l'impact les facteurs de risques modifiables (hypertension, dyslipidémies, diabète, cigarette, alcool et sédentarité).

En parallèle, il faudrait continuer la recherche afin d'améliorer le dépistage, le contrôle et les options thérapeutiques disponibles.

Tableau 1 : facteurs influençant l'incidence des maladies cardiovasculaires

Facteurs indépendants de la pathologie		Facteurs étiologique	
Progrès médicaux (détection, prévention et soins)	↘	Obésité et Diabète de type 2	↗
Recul des maladies infectieuses ²⁰	= mais augmente la part attribuée aux maladies non infectieuse	Tabagisme/ alcoolisme	↗
Système de sécurité sociale efficace	Impact : procédés médicaux	hypertension	↗
Niveau de développement économique élevé	Impact : procédés médicaux et habitudes nutritionnelles	Stress	↗
Vieillessement de la population ^{3,21}	↗	Sédentarité	↗
Habitudes nutritionnelles, alimentation occidentale	↗	Génétiques	possible ↗

I,2°) Facteurs de risques modifiables et non modifiables.

I,2,1°) Hypertension

La tension représente la force (pression) exercée par le sang sur les parois des vaisseaux ; on l'exprime en mm de mercure. L'hypertension est diagnostiquée par une pression supérieure à 140/90 (systolique/diastolique) mm Hg.

En France, les chiffres de l'étude MONA LISA (2007) montrent une prévalence de l'hypertension de 23,9% chez les hommes de 35-44 ans et 79,8% chez les séniors (65-74 ans). La prévalence est plus faible chez les femmes avec 8,6% chez les 35-44 ans et 71,3 % chez les séniors²². Malgré l'absence de données récentes sur l'île de la Réunion, on a recensé 46% d'hypertendus chez les hommes de 30-69 ans contre 44% chez les femmes en 1999 lors de l'étude RÉDIA²³. Ces chiffres sont à comparer avec l'étude de la caisse d'assurance maladie²⁴ où la prévalence de l'hypertension est de 24,9% chez les hommes de plus de 35ans et 28,2% chez les femmes. Dans les années 2000, La Réunion comptait donc un nombre de patients hypertendus presque deux fois supérieur à la métropole. Une étude de la DRESS plus récente (2014) qui étudie le nombre de patients sous hypertenseur dans différentes régions indique que 18,7% de la population Réunionnaise souffre d'HTA, ce qui est très légèrement supérieur à la moyenne nationale (18,6%) mais les différences entre les régions sont très importantes et La Réunion reste parmi les régions les plus touchées¹⁷.

Les données épidémiologiques montrent une forte corrélation entre hypertension et les MCV, avec un taux de mortalité cardiovasculaire qui double tous les 20 mmHg, modulé par l'âge et le sexe^{25,26}.

Les paramètres qui peuvent influencer la tension sont : le volume sanguin, la compliance et la taille des vaisseaux. De ce fait, une augmentation de la pression artérielle peut résulter, par exemple, d'une diminution de la compliance aortique due à l'âge ^{27,28}, de changements de la composition des électrolytes du tissu sanguin (induite par des problèmes rénaux ou à une alimentation trop riche en sodium)^{29,30}, et de nombreux autres facteurs modifiables (alcool, tabac, stress etc..) ou non modifiables (génétiques, infections).

L'augmentation de cette force sur la paroi aortique entraîne un stress mécanique sur les cellules endothéliales, ce qui participe à la dysfonction endothéliale³¹, facilite l'accumulation de lipides dans l'intima³²⁻³⁴, augmente la mobilisation des cellules musculaires lisses³⁵ et modifie la synthèse d'agents vasodilatateurs³⁶. En conclusion, l'hypertension est aussi un des facteurs de risque majeur de rupture de plaque³⁷ ce qui explique pourquoi une diminution thérapeutique de la pression sanguine permet de diminuer la mortalité cardiovasculaire³⁸.

I,2,2°) Diabète, obésité et dyslipidémie.

Un autre facteur de risque important dans le développement de la plaque d'athérosclérose, et donc des maladies cardiovasculaires, concerne les modifications du métabolisme énergétique. Un sous-chapitre sera consacré au métabolisme des lipides plus loin dans cette introduction générale, mais pour mettre en évidence le lien entre diabète, obésité et dyslipidémie, il faut expliciter en quoi ces pathologies sont liées au métabolisme des lipides et en quoi le métabolisme des lipides est relevant en ce qui concerne l'athérosclérose.

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols ; Il est principalement synthétisé au niveau des hépatocytes et des cellules de la muqueuse intestinale. Il a un rôle très important dans la composition des membranes cellulaires, la fabrication d'hormones stéroïdiennes, de certaines protéines, de la bile et de la vitamine D. Pour acheminer le cholestérol des organes qui le produisent aux cellules qui l'utilisent, celui-ci est transporté sous forme libre ou estérifiée, entouré de phospholipides et de protéines structurales, d'où leur nom de lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont classées en différentes catégories en fonction de leur densité, et du type de protéine structurale qui les composent. Dans le cas du transport du cholestérol vers les organes, cette lipoprotéine s'appelle LDL ou VLDL et dans le cadre du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, ces lipoprotéines s'appellent HDL. Les LDL, très riches en cholestérol, sont très fortement associées au développement de la plaque d'athérosclérose car elles sont en parties à l'origine de l'accumulation du cholestérol dans la plaque^{39,40}. Les LDL se retrouvent dans la circulation et peuvent parfois traverser la barrière endothéliale¹², se retrouvant piégées dans l'intima, où elles peuvent subir des modifications qui les rendent pro-athérogènes⁴¹. Étant donné leur place centrale dans la pathologie, il a été montré que des modifications de la concentration circulante^{42,43}, du type⁴⁴, de la composition lipidique⁴⁵, et des modifications secondaires que subissent ces lipoprotéines⁴⁶, vont influencer leur chance de passer à travers une barrière endothéliale saine, de rester bloquées et donc accélérer le développement de la plaque d'athérosclérose ou la déstabiliser.

Les dyslipidémies sont définies comme des concentrations anormales de lipides dans le sang. Classiquement, les recommandations sont que les triglycérides soient en dessous de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, un HDL-cholestérol supérieur à $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ et des valeurs de LDL-cholestérol (la valeur la cible la plus importante) en dessous de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ pour les patients les plus à risques et en dessous de $1,15 \text{ g.L}^{-1}$ pour les patients à faible risque ⁴⁷.

Les dyslipidémies primaires ont une étiologie génétique touchant divers allèles⁴⁸, et les dyslipidémies secondaires ont des origines environnementales (hygiène de vie)^{49,50} ou consécutives à une maladie métabolique (obésité et diabète)⁵¹. De nombreux allèles mutés influant sur la synthèse, le captage ou l'excrétion du cholestérol ont été à l'origine des découvertes

principales dans le métabolisme des lipides et dans leurs liens avec l'athérosclérose. Mais à l'origine, la dyslipidémie est le plus souvent le résultat d'une surcharge métabolique (ex : obésité) qui donne lieu à une réponse inflammatoire qui va déréguler l'homéostasie lipidique.

L'obésité désigne une augmentation de la proportion des tissus adipeux. Elle est diagnostiquée si l'indice de masse corporelle est supérieure à 30 après pondération par l'âge et le sexe. Les chiffres épidémiologiques français⁵² montrent une augmentation importante du nombre de patients obèses depuis 1997 (8,5% de la population), passant à 10,1% en 2000 et se stabilisant depuis 2009 (15%). A la Réunion l'enquête RECONSAL de la cohorte REDIA des années 2000 note 15% d'obèses et 35% de personnes en surpoids. Mais l'étude REDIA2 (2006-2009) montre une amélioration sensible des comportements, dont les résultats se rapprochent plus de la métropole bien que restant légèrement supérieurs⁵³.

La cause principale reste l'hygiène de vie des pays développés qui ont une tendance à la sédentarité et à adopter des régimes alimentaires hypercaloriques. Physiologiquement, l'obésité est consécutive à un excès chronique d'apport en glucides/lipides ce qui augmente les taux de VLDL – LDL-cholestérol et/ou diminue le taux de HDL⁵⁴. Pour éviter la dyslipidémie chronique ainsi engendrée, les adipocytes répondent en augmentant leurs capacités de stockage des lipides, soit en se divisant (hyperplasie) soit en augmentant leur volume (hypertrophie). L'hypertrophie des adipocytes semble être à l'origine des changements constatés dans leurs sécrétions chez les individus obèses⁵⁵⁻⁵⁷. Ces adipocytes pro-inflammatoires secrètent des cytokines chemo-attractrices (IL-6 ; MCP-1 ; IL-8 ; TNF- α ; MCP-1 ; Interféron- γ , ...) ⁵⁷ qui recrutent des macrophages dans le tissu adipeux. Au début, les macrophages sont de type M2 (profil anti-inflammatoire) mais l'inflammation chronique entraîne un changement phénotypique de ces macrophages vers un type M1 (pro-inflammatoire⁵⁸), ce qui favorise l'hypertrophie des adipocytes. Ce phénomène s'auto-amplifie, entretenant un statut inflammatoire dans le tissu adipeux ce qui entraîne alors d'autres dysfonctions chez les adipocytes hypertrophiés notamment une baisse de la sécrétion d'adiponectine⁵⁹ (une adipokine pleiotrope qui joue un rôle anti-inflammatoire, anti-athéromateux et antidiabétique par son action sur la sensibilité des organes à l'insuline) et de l'expression de la lipoprotéine lipase⁶⁰ (une des enzymes clés du métabolisme, sécrétée par les cellules musculaires et les adipocytes, capable d'hydrolyser les triglycérides des lipoprotéines pour récupérer les acides gras utilisés par le tissu sous-jacent). Au final, la concentration plasmatique d'acides gras libres va augmenter, et ils vont effluer vers le foie ⁵⁵. La saturation du foie en acides gras libres favorise la production de VLDL⁶¹, ce qui va entraver la prise en charge des chylomicrons produits par l'intestin, principalement par compétition au niveau de la lipoprotéine lipase⁶¹ qui elle-même est diminuée chez les patients obèses⁶⁰. Dans ces conditions, une protéine appelée « protéine de transfert d'ester de cholestérol (CETP) » va transférer le cholestérol et les triglycérides entre les HDL et les VLDL, et favoriser le transfert par la lipase hépatique de triglycérides et phospholipides hors des LDL. Cela entraîne la formation de plus

petites LDL^{62,63} qui ont un temps de clairance augmenté⁶⁴ et qui passent plus facilement la barrière endothéliale pour se retrouver piégées dans *l'intima*^{65,66}.

Il existe un lien entre alimentation, obésité, dyslipidémie et, comme le suggère la baisse de sécrétion d'adiponectine par les adipocytes hypertrophiés, avec une autre pathologie métabolique très présente à la Réunion : le diabète de type II .

Le diabète de type II est caractérisé par une glycémie supérieure à 1,26 g.L⁻¹, due à une diminution de la sensibilité à l'insuline (une hormone qui favorise l'absorption et le stockage du glucose au niveau des cellules du foie, des cellules adipeuses et des cellules musculaire). La cohorte REDIA2 révèle une prévalence régionale du diabète de type I traité supérieure à la métropole ⁵³ avec 9,8% de la population contre 4,6% en métropole.

L'augmentation des taux de glucose circulant conduit à de nombreuses pathologies avec des atteintes nerveuses périphériques⁶⁷, des atteintes du système visuel⁶⁸, des néphropathies diabétiques, etc...

A l'origine de ces pathologies, l'augmentation de la glycémie qui provoque la modification des protéines par des réactions de Maillard, formant dans un premier temps des produits d'Amadori (réversibles) puis, des produits avancés de glycations (AGE, irréversibles). On retrouve notamment une glycation de l'hémoglobine⁶⁹, de l'albumine⁷⁰ et de l'ApoB100 des LDL⁷¹. Ces modifications des LDL les rendent plus toxiques pour les cellules^{72,73} notamment lors de leur phagocytose au niveau de la plaque d'athérosclérose⁷⁴. Elles sont aussi plus immunogènes, car on retrouve des auto-anticorps dirigés contre les formes modifiées de la lipoprotéine chez certains patients⁷⁵. En plus de son rôle dans la modification secondaire des protéines circulantes, l'augmentation du taux de glucose sanguin participe au processus de dysfonction endothéliale, notamment via la diminution de la biodisponibilité du NO produit par les cellules endothéliales. Différents mécanismes expliquent cette baisse : la diminution de l'activité de la NO synthase⁷⁶ (enzyme produisant le NO) et l'augmentation de la production d'anions superoxydes (O⁻) qui réagissent avec le NO pour former le ONOO⁻ qui perd ses capacités vasodilatatrices, antithrombotiques et anti-inflammatoires. Enfin il est très important de noter que la diminution de la sensibilité à l'insuline a une influence majeure dans le métabolisme lipidique, par son rôle dans la mobilisation des acides gras stockés dans les adipocytes et de l'activité de la lipoprotéine lipase. Le syndrome métabolique est fortement corrélé avec le diabète⁷⁷, mais aussi avec les maladies cardiovasculaires⁷⁸.

Le diabète, l'obésité et la dyslipidémie favorisent l'athérogenèse de manière synergique ce qui est inquiétant dans un contexte régional où la fréquence de ces pathologies est supérieure à la moyenne nationale.

I,2,3°) Variants génétiques

Historiquement, la découverte d'un certain nombre de mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose résulte de l'étude de variants alléliques au sein de la population.

L'exemple le plus connu est celui de la découverte du récepteur au LDL chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale¹². Le récepteur aux LDL est normalement présent à la surface des cellules et leur permet de récupérer le cholestérol à partir des lipoprotéines circulantes après endocytose. Dans le cas de l'hypercholestérolémie familiale, qui touche 1 personne sur 250 dans le monde (pour sa forme hétérozygote), toute mutation qui provoque une diminution la quantité de récepteur à la surface des cellules augmente fortement le temps de clairance des LDL dans la circulation et par conséquent favorise le développement de plaques d'athérome.

De nombreuses autres mutations, touchant les gènes codants des protéines importantes pour l'homéostasie énergétique ont depuis été décrites ⁷⁹. Parmi les mutations monogéniques dans la famille des hypercholestérolémies familiales on peut citer par exemple les modifications de l'apoB100 ⁸⁰ (protéine structurale des LDL), de PCSK9 ⁸¹ (qui régule le recyclage des LDLR), de l'ATP binding cassette ABCA1⁸² et des transporteurs ABCG1⁸³ et 8 ⁸⁴ (qui relarguent une partie du cholestérol absorbé dans la lumière intestinale).

Bien que ces mutations gain/ pertes de fonctions soient les plus étudiées du fait du lien bien établi entre hypercholestérolémie et athérosclérose, il est probable que des mutations plus discrètes, touchant à des mécanismes plus difficilement observables cliniquement, jouent aussi une part importante dans le développement de plaques d'athérome chez l'homme. Ainsi, tout facteur génétique pouvant moduler la fonction endothéliale, l'hypertrophie des adipocytes, l'efficacité des entérocytes, des macrophages, des hépatocytes ou des cellules β pancréatiques pourraient avoir un impact sur le développement de l'athérosclérose. Des études d'association du génome complet avec l'athérosclérose⁸⁵ ont permis d'étayer cette hypothèse, avec par exemple le cas d'enzymes liées à l'oxydation des lipoprotéines⁸⁶ et donc facilitant leur entrée dans l'espace intimal et leur potentiel athérogène.

De ce fait, la contribution de la génétique à l'athérosclérose est bien caractérisée pour les personnes souffrant d'hypercholestérolémie familiale, mais l'impact réel des mutations discrètes est plus difficile à évaluer en pratique.

Enfin, des changements épigénétiques peuvent être associés à l'athérosclérose⁸⁷. Des modifications épigénétiques, on pu être observées au niveau de la plaque d'athérosclérose, qui représentent des réponses cellulaires aux conditions locales d'inflammation, de pression⁸⁸ et de stress. L'étude des modifications épigénétiques est importante pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques d'évolution de la plaque et potentiellement comme cible thérapeutique⁸⁹.

I,2,4°) Autre facteurs de risques

Le tabagisme en France a fortement diminué dans la population masculine, des années 1950 à 2005-2010 où il se stabilise à 32% de fumeurs. En revanche, le tabagisme a augmenté chez les femmes durant cette même période (il concerne 26% de la population féminine) (source gouvernementale, septembre 2017). Cette pratique est associée à une surmortalité de 50% avec en moyenne 10 ans d'espérance de vie en moins. Parmi les pathologies aggravées par le tabagisme on retrouve en première place le cancer du poumon chez les gros fumeurs. Et en second les maladies cardiovasculaires, même chez les fumeurs moyens à légers⁹⁰. Le tabagisme agit sur les accidents cardiovasculaires à de nombreux niveaux : le tabagisme agit sur la dyslipidémie en augmentant le taux plasmatique de LDL-C et en diminuant les taux de HDL-C⁹¹, principalement par une diminution de l'activité la lipoprotéine lipase⁹² ce qui favorise la dyslipidémie tout en diminuant le transport inverse du cholestérol, ce qui accentue l'effet pro-athérogène. Fumer augmente aussi la concentration plasmatique d'une enzyme la Lp-PLA2⁹³ (lipoprotéine associée phospholipase A2), un facteur pro-athérogène, qui est lié majoritairement aux LDL et qui a pour fonction d'hydrolyser un large éventail de phospholipides, produisant essentiellement de la lysophosphatidylcholine qui est un facteur pro-inflammatoire favorisant le recrutement de monocytes et la dégranulation des neutrophiles. La Lp-PLA2 est liée aux petites particules de LDL et reste inactive tant que la petite particule de LDL n'a pas été soumise à l'oxydation⁹⁴. De plus, les nombreuses molécules pro-oxydantes contenues dans la fumée de cigarette contribuent fortement à la dysfonction endothéliale⁹⁵, qui entraîne une diminution de la sécrétion de NO provoquant l'hypertension et qui favorise le processus de coagulation via l'activation des plaquettes⁹⁶. Enfin, le tabagisme favorise le développement de la néphropathie chronique⁹⁷ et de la stéatose hépatique non alcoolique⁹⁸ qui sont tous les deux des facteurs de risques cardiovasculaires^{99,100}. Néanmoins des ajustements comportementaux sont préconisés par les recommandations européennes de 2016⁴⁷. En effet, l'arrêt de la cigarette réduit de manière rapide et importante les risques cardiovasculaires¹⁰¹.

La consommation d'alcool a un effet ambivalent sur l'athérosclérose : une consommation modérée (1 verre/jour pour les femmes ; 2/jour pour les hommes) semble être athéroprotecteur, bien qu'avec une amplitude d'effet faible¹⁰². Cet effet est lié à un grand nombre d'interactions au niveau de plusieurs organes, détaillées dans l'excellente revue de Paul A. Cahill et Eileen M. Redmond¹⁰³. A l'inverse, une consommation excessive d'alcool semble accentuer les risques cardiovasculaires^{104,105}.

La sédentarité est aussi un facteur de risque modifiable important : la pratique d'un effort physique modéré (300 min d'exercice aérobie¹⁰⁶ + renforcement musculaire/ semaine) est associé à une diminution de la mortalité toutes causes confondues. A l'inverse, de nombreuses

études épidémiologiques ont permis de démontrer qu'un mode de vie sédentaire (moins de 75 min d'effort modéré/semaine) est un facteur indépendant de risque cardiovasculaire^{107,108,109}.

Les bénéfices de l'effort physique touchent de multiples mécanismes relevant dans le cadre de l'athérosclérose et des MCV : l'exercice physique induit une diminution du niveau basal de cytokines pro-inflammatoires, et augmente la concentration de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-6¹¹⁰ qui va diminuer la sécrétion de TNF α (pro-inflammatoire) par les macrophages, ce qui a un impact important sur la dysfonction endothéliale et le statut inflammatoire de la plaque d'athérosclérose. Il va aussi augmenter la quantité de cellules sécrétrices de l'insuline dans le pancréas^{111,112}, la sensibilité du muscle¹¹³ et du tissu adipeux¹¹⁴ (chez la souris) à l'effet de l'insuline, via l'AMPK^{115,116}, ce qui a pour effet de diminuer la quantité de sucres¹¹⁷ et de triglycérides circulants¹¹⁸.

En plus de ce rôle anti-inflammatoire, l'exercice physique va aider à réguler en partie la tension¹¹⁹, via la diminution de la dysfonction endothéliale¹²⁰ due à l'augmentation de la synthèse et de la biodisponibilité du NO, la diminution du niveau inflammatoire basal et la restauration du pool de cellules progénitrices endothéliales circulantes¹²¹ (chargées de la réparation de l'endothélium vasculaire).

Les régimes alimentaires trop riches en graisse, en sucre ou à trop forte balance calorique jouent un rôle primordial, avec la sédentarité, dans le développement de l'athérosclérose en favorisant diabète, obésité et dyslipidémie. Les recommandations proposées⁴⁷ par le groupe de travail européen ont pour objectif d'atteindre un indice BMI (« *Body mass index* ») entre 20 et 25 et recouvrent (généralement) les besoins alimentaires. Les polyphénols sont abondamment présents dans les végétaux et sont donc essentiellement fournis par l'alimentation. De plus en plus de preuves semblent indiquer un rôle protecteur de certains polyphénols contre divers mécanismes d'athérogenèse, ce qui en fait des propositions thérapeutiques intéressantes. Les polyphénols, seront traités en détail dans le chapitre III.

Une figure récapitulative des différents facteurs de risques et de leurs liens avec l'établissement d'une plaque d'athérosclérose instable est proposé en **Figure 1**.

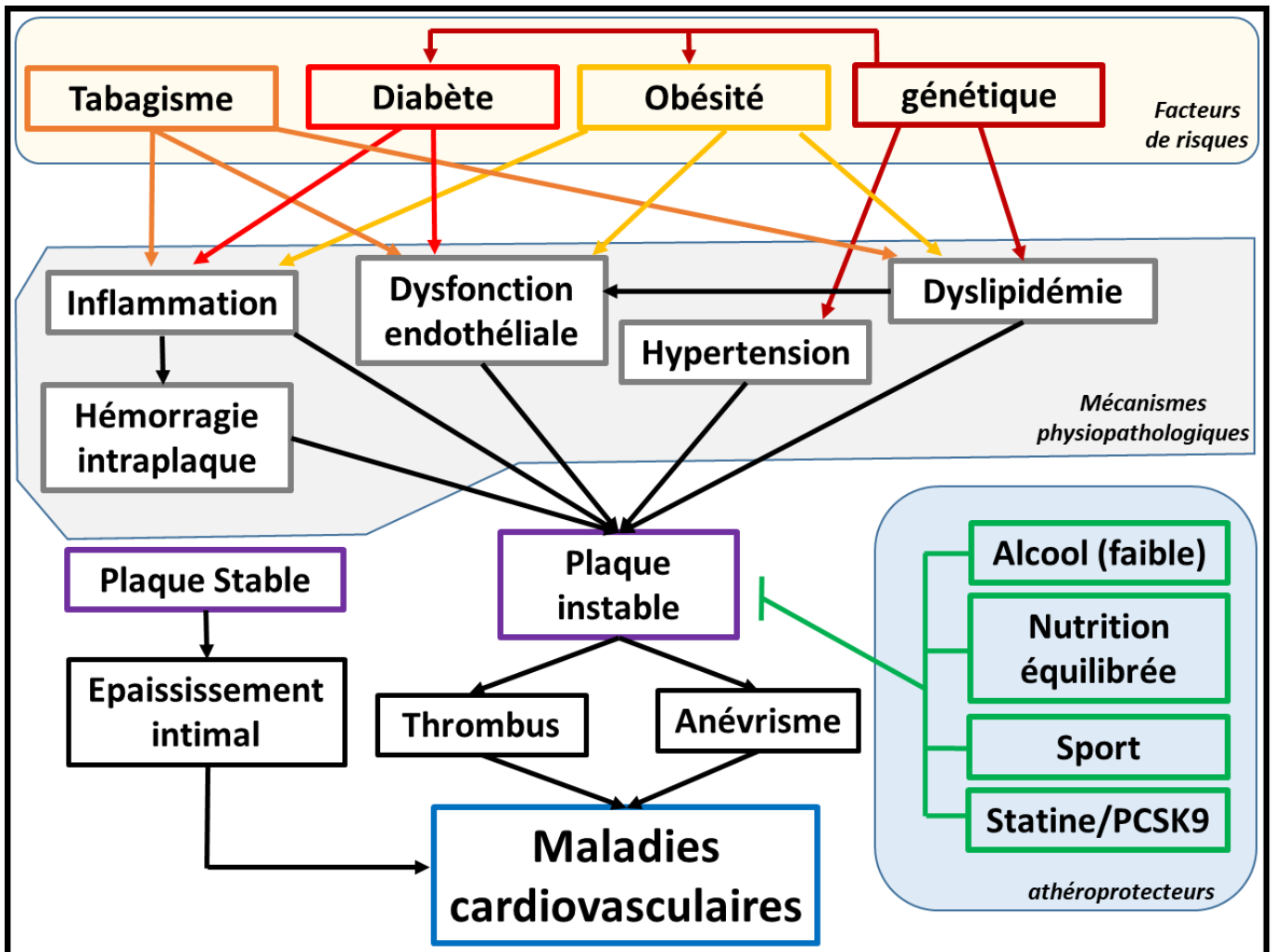


Figure 1 : Facteurs de risques modifiables et non modifiables des maladies cardiovasculaires. Plusieurs mécanismes conduisent à la formation de plaques d'athérosclérose instables. Ces plaques sont caractérisées par une combinaison des éléments suivants : un endothélium dysfonctionnel, un cœur nécroticolipidique important, la présence de nombreuses cellules spumeuses, une fine chape fibreuse et une invasion de l'intima par de nombreux *vasa vasorum*.

I,3°) Athérogenèse

I,3,1°) Aorte saine.

Le système cardiovasculaire humain possède plusieurs rôles au sein de l'organisme : transporter les nutriments et l'oxygène nécessaire à la respiration aérobie des cellules de l'organisme, mais aussi celui des différentes molécules de signalisation (hormones, cytokines, myokines...) et il joue un rôle crucial dans la veille et la coordination du système immunitaire. Constitué de l'arbre circulatoire (aorte, veines etc..) et d'un organe pompe (le cœur) à deux temps et quatre chambres, composé principalement de cardiomyocytes (cellules musculaires striées) et de cellules pacemaker qui permettent la stimulation contractile des cardiomyocytes, il est indépendant du système nerveux central. Cependant On retrouve aussi une innervation modulatrice (sympathique et parasympathique) du système nerveux central via les fibres de Purkinje. Cet organe fonctionne en circuit fermé à travers l'arbre circulatoire qui permet d'assurer le transport du sang partout dans l'organisme. L'arbre circulatoire est constitué de trois types de vaisseaux sanguins aux diamètres et à l'organisation différente. Les plus larges des vaisseaux sanguins sont les artères (qui vont nous intéresser particulièrement dans ce chapitre car c'est dans ces vaisseaux que l'on retrouve principalement les plaques d'athérosclérose responsables des maladies cardiovasculaires) puis les veines qui ont en général un diamètre inférieur et enfin les plus petits vaisseaux sanguins sont appelés capillaires. (Le **tableau 2** récapitule la taille et la composition générale des différents acteurs de l'arbre vasculaire)

La circulation est répartie en deux systèmes : la circulation pulmonaire, qui concerne un seul organe : les poumons, permet de recharger le sang appauvri en oxygène et la circulation systémique qui distribue le sang hématosé (riche en oxygène) aux organes (**figure 2**).

La circulation systémique commence dans le ventricule gauche avant de se déverser, lors de la systole ventriculaire, dans l'aorte. La pression locale est alors importante et la courbure de la crosse aortique entraîne des perturbations hémodynamiques ce qui aboutit à des forces de cisaillement importantes qui stressent les cellules endothéliales (voir plus loin) et favorisent l'installation de plaques d'athérosclérose¹²². De l'aorte, le sang se répartit dans les artères élastiques, plus compliantes, puis les artères musculaires qui rejoignent les tissus et se divisent en artérioles puis en capillaires où les échanges avec les cellules ont lieu. Le sang appauvri en oxygène est ensuite récupéré dans les veinules post-capillaires qui rejoignent les veinules qui sortent de l'organe et partent rejoindre les veines en direction de la veine cave.

Tableau 2	Diamètre de la lumière	Epaisseur de la paroi	CML	Composition de la média		Innervation
				Elastine	Collagène	
Artères élastiques	1 à 2 cm	2 mm	+++	+++	I, III	+
Artères musculaires	1 mm à 1 cm	1 mm	+++	+	I, III	++
Artérioles	30 µm	20 µm	+	+/-	I, III	+++
Capillaires	5 à 8 µm	1 µm	0	0	IV, V	+/-
Veinules post-capillaires	20 µm	2 µm	0	+/-		+/-
Veinules	0,5 cm	0,5 mm	+	+/-		+
Veines	1 à 3 cm	1,5 mm	+	+/-		+

Source : cours de Stéphane Frayon, Carines Ceuille, Roger Prat et Jean-Michel Garel de l'UPMC-UFR de Biologie (dernières modification le 28 juin 2005).

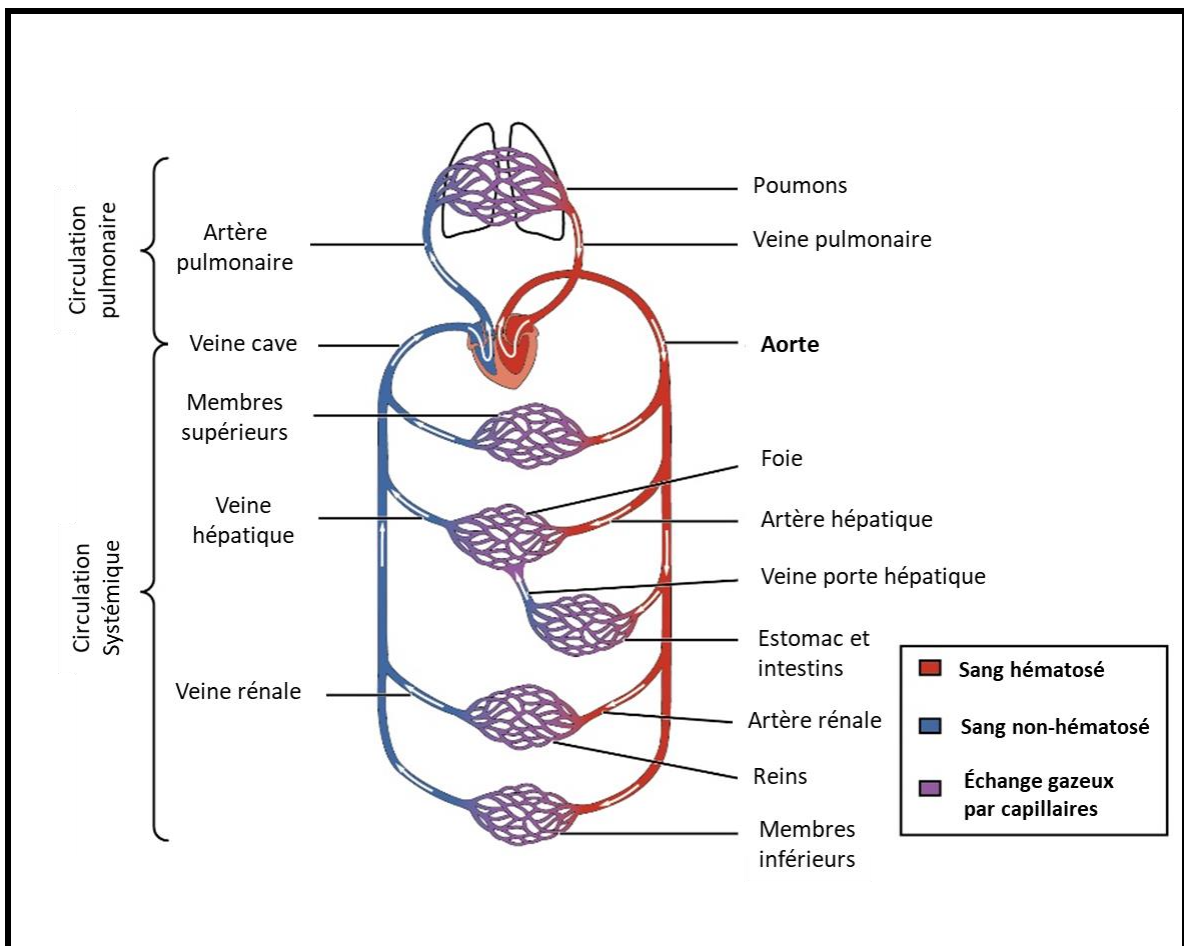


Figure 2 : Représentation schématique du réseau circulatoire. Le sang hématosé est transporté dans le corps via les veines et les artères et les échanges gazeux ont lieu au niveau des vaisseaux de très faible diamètre sans média ni adventice (capillaires). Le sang s'appauvrit en oxygène et va retourner au cœur pour repartir vers la circulation pulmonaire où il sera à nouveau chargé en oxygène.
Source : opensource educational.

Il existe dans ce système des zones où les forces hémodynamiques sont perturbées et où le sang ne s'écoule plus en flux laminaire (courbures, embranchements, sténoses). Les cellules endothéliales sous-jacentes subissent des modifications transcriptionnelles qui aboutissent à une augmentation de l'apoptose et à la sénescence de ces cellules, mais également à celle de la perméabilité vasculaire, de l'expression des gènes pro-inflammatoires et de la prolifération des cellules endothéliales pour tenter de contrebalancer ces effets ¹²³.

Les artères sont constituées de trois tuniques distinctes : de la lumière vers l'extérieur on retrouve (voir **figure 3 et 4**) :

- **L'intima (figure 4.1)** : constituée de cellules endothéliales jointes les unes aux autres par des molécules de jonction serrées (JAM, ESAM, claudines, VE-cadhérin etc...) et coiffées d'un glycocalix (riche en protéoglycan et très électronégatif), elles assurent un rôle primordial dans l'athérosclérose, par leur rôle de barrière pour empêcher l'accumulation de LDL, mais aussi dans la gestion de la pression artérielle par leur synthèse de NO. Cette couche de cellules endothéliales pavimenteuses simples, repose sur une lame basale soutenue par du tissu conjonctif et est séparée de la média par une couche protéique de fibres élastiques : la limitante élastique interne. C'est entre la limitante élastique interne et le tissu conjonctif que s'accumulent les lipoprotéines responsables de la formation des stries lipidiques et plus tard des plaques d'athérosclérose.
- **La media (Figure 4.2)** : constituée de cellules musculaires lisses, organisées en faisceaux concentriques ; elles synthétisent les fibres élastiques, plus ou moins présentes dans cette tunique en fonction du type d'artère. Son rôle est primordial dans la gestion de la pression par ses propriétés mécaniques (fibres élastiques) et contractiles (cellules musculaires lisses). La media est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe (même composition que l'interne).
- **L'adventice (Figure 4.3)** : est constituée essentiellement de tissus conjonctifs synthétisés par des fibroblastes et de petits capillaires appelées *Vasa Vasorum*. On retrouve aussi parfois quelques cellules musculaires lisses et une innervation (faible), localisée en général entre la média et l'adventice.

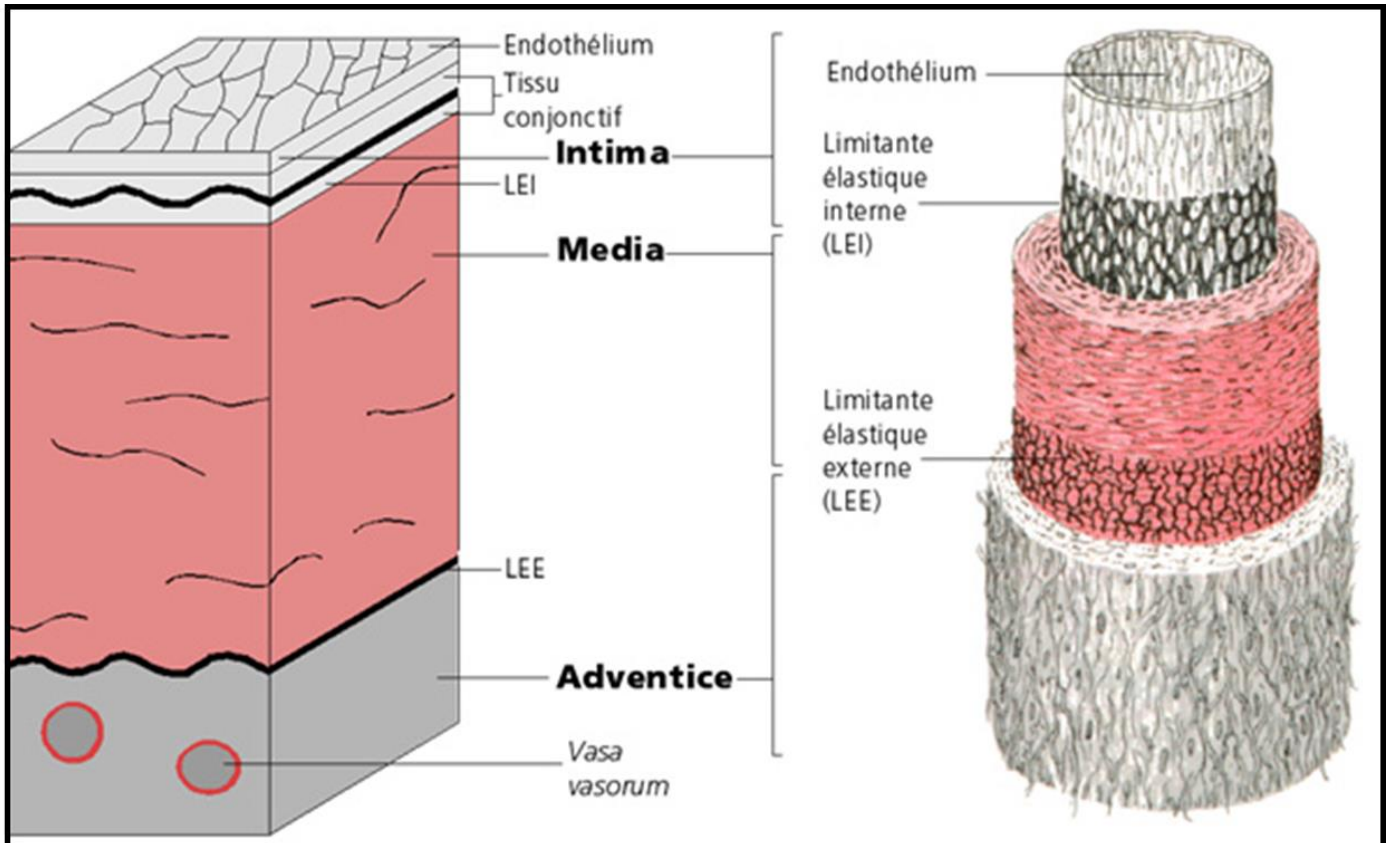


Figure 3 : Schéma d'une artère humaine. *L'intima* est constituée de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et d'une couche de tissu conjonctif sous-jacente plus ou moins fine. Cette couche est séparée de la média par lame composée de fibres élastiques : la limitante élastique interne. C'est dans l'intima que se développent les plaques d'athérosclérose. La *média* est essentiellement constituée de cellules musculaire lisses (CML) et est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe. *L'adventice* est constituée de différents types cellulaires comprenant des CML, des fibroblastes et une microvasculature capillaire appelée *vasa vasorum* dont la densité augmente avec la taille de l'artère. *Source : Histologie Humaine, édition DeBoeck.*

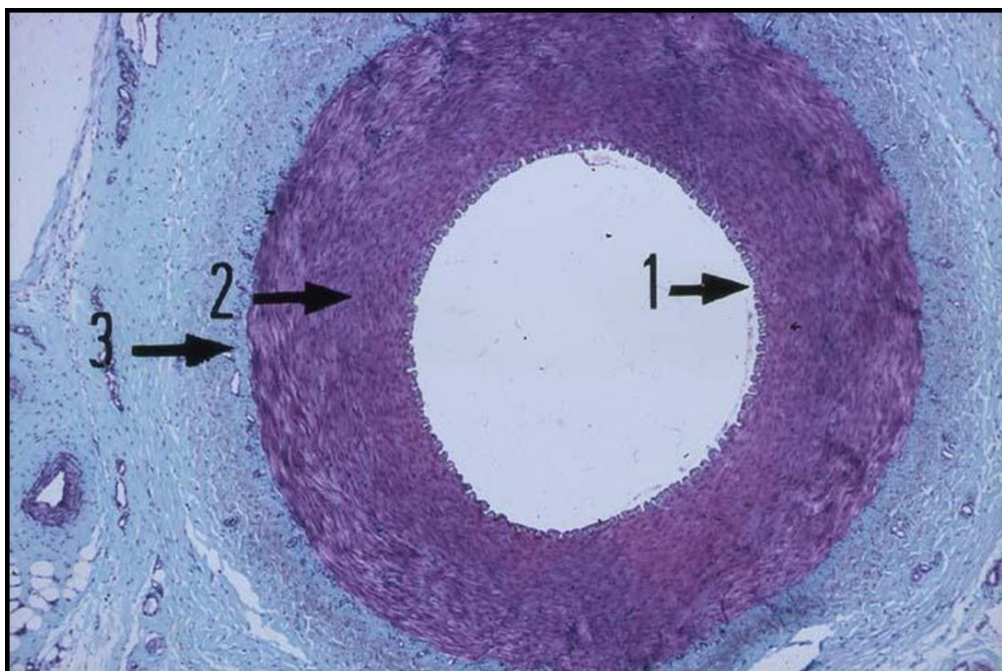


Figure 4 : Histologie d'une artère de moyen calibre (coupe transversale) colorée au trichrome de Masson (colore les noyaux en violet, le cytoplasme des cellules en rose et le collagène en bleu). 1 : intima, 2: media, 3 adventice.

Source : R. Thibault, G. Vincke, E. Depiereux et M. Raes : Atlas d'histologie Humaine et animal. « <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/> »

I,3,2°) Métabolisme des lipides

Les lipides font partie d'une grande famille de molécules qui possèdent des propriétés hydrophiles et hydrophobes. Les lipides biologiques sont composés de groupes cétoacyle et isoprène, et on peut les classer en huit catégories : les acides gras, les acylglycérols, les phosphoglycérides, les sphingolipides, les glycolipides et les polycétides. Par leurs propriétés hydrophobes et hydrophiles, les lipides s'auto-assemblent, en condition aqueuse, soit en micelle, soit en bicouche. Ces molécules sont donc parfaites pour faire des vésicules (micelles) ou des bicouches lipidiques (membranes). En plus de ces rôles essentiels, certains lipides peuvent aussi être utilisés par les cellules comme source d'énergie, comme source d'ATP via la respiration aérobie. Le cholestérol et les triglycérides font partie de ces lipides biologiques très utilisés par les cellules. Ils peuvent être obtenus par deux voies principales : la voie exogène (alimentation) ou endogène (catabolisme des lipoprotéines)

Au niveau de l'alimentation, des lipides sont captés dans l'intestin grêle. Les lipides principaux de l'alimentation sont les triglycérols, les phospholipides et les stérols. Les triglycérides (TG) sont dégradés par la lipase pancréatique (triglycéride lipase) et par les phospholipases. Ces réactions permettent la libération d'acides gras libres (FFA pour Free fatty Acids), de 2 monoacylglycérol et de phospholipides. Ces FFA, grâce à leur propriété détergente, accélèrent le processus en réduisant les graisses en fines particules avec l'aide des sels biliaires. Ces acides gras et le 2-monoacylglycérol sont absorbés par les entérocytes¹²⁴ où ils sont recombinaés en TG. Ces TG sont ensuite associés à une protéine : l'apolipoprotéine B48 (ou ApoB48) dans le réticulum endoplasmique rugueux. Il va ensuite passer par le réticulum endoplasmique lisse, puis le golgi, tout en se chargeant de TG et en s'associant à deux nouvelles apolipoprotéines : l'ApoA-IV puis l'ApoA1. On appelle alors ces lipoprotéines des chylomicrons.

Les lipoprotéines sont des supra structures globuloïdes composées de protéines (apolipoprotéines) et de lipides.

La couche extérieure des lipoprotéines est principalement constituée par des phospholipides et des apolipoprotéines (qui jouent un rôle dans la stabilité et l'adressage des lipoprotéines vers les tissus correspondants) tandis que l'intérieur des lipoprotéines est constitué de triglycérides et d'esters de cholestérol (voir **figure 5**).

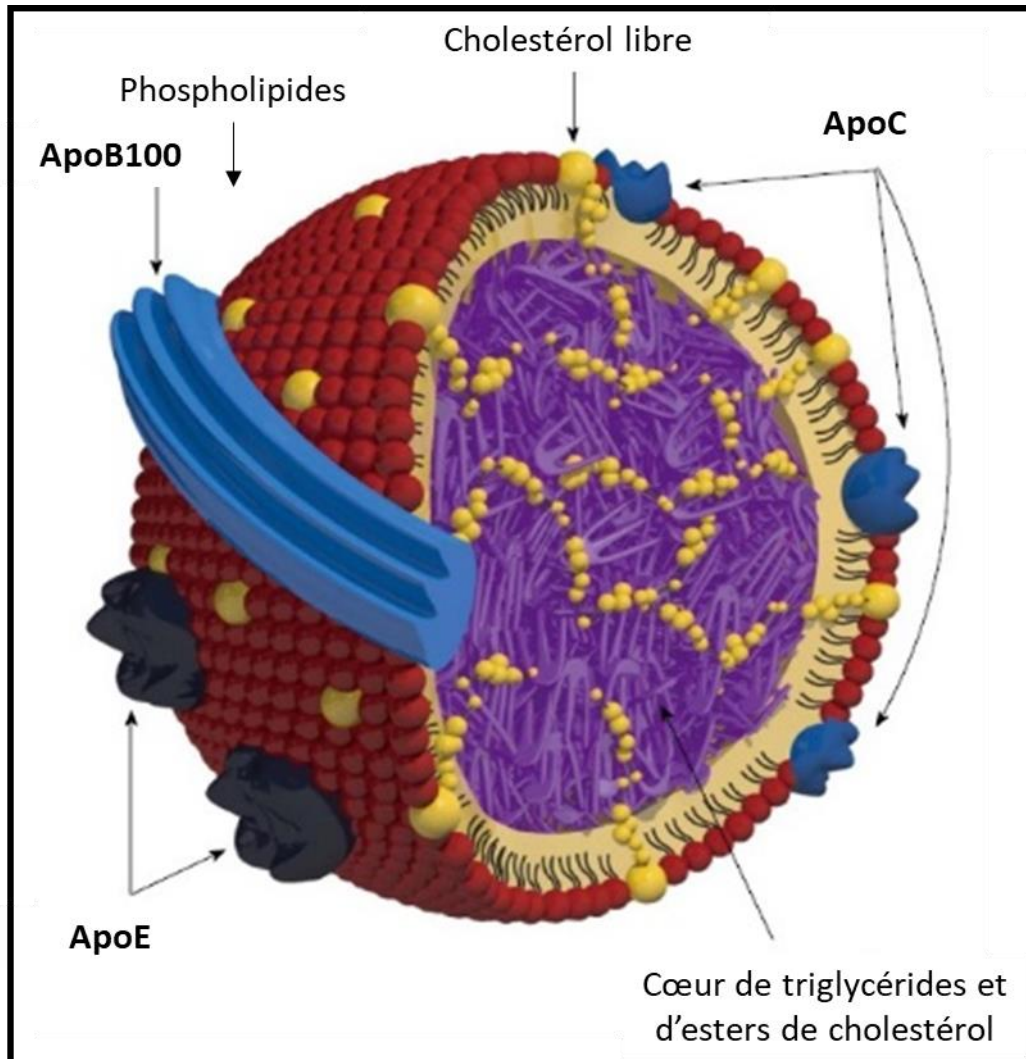
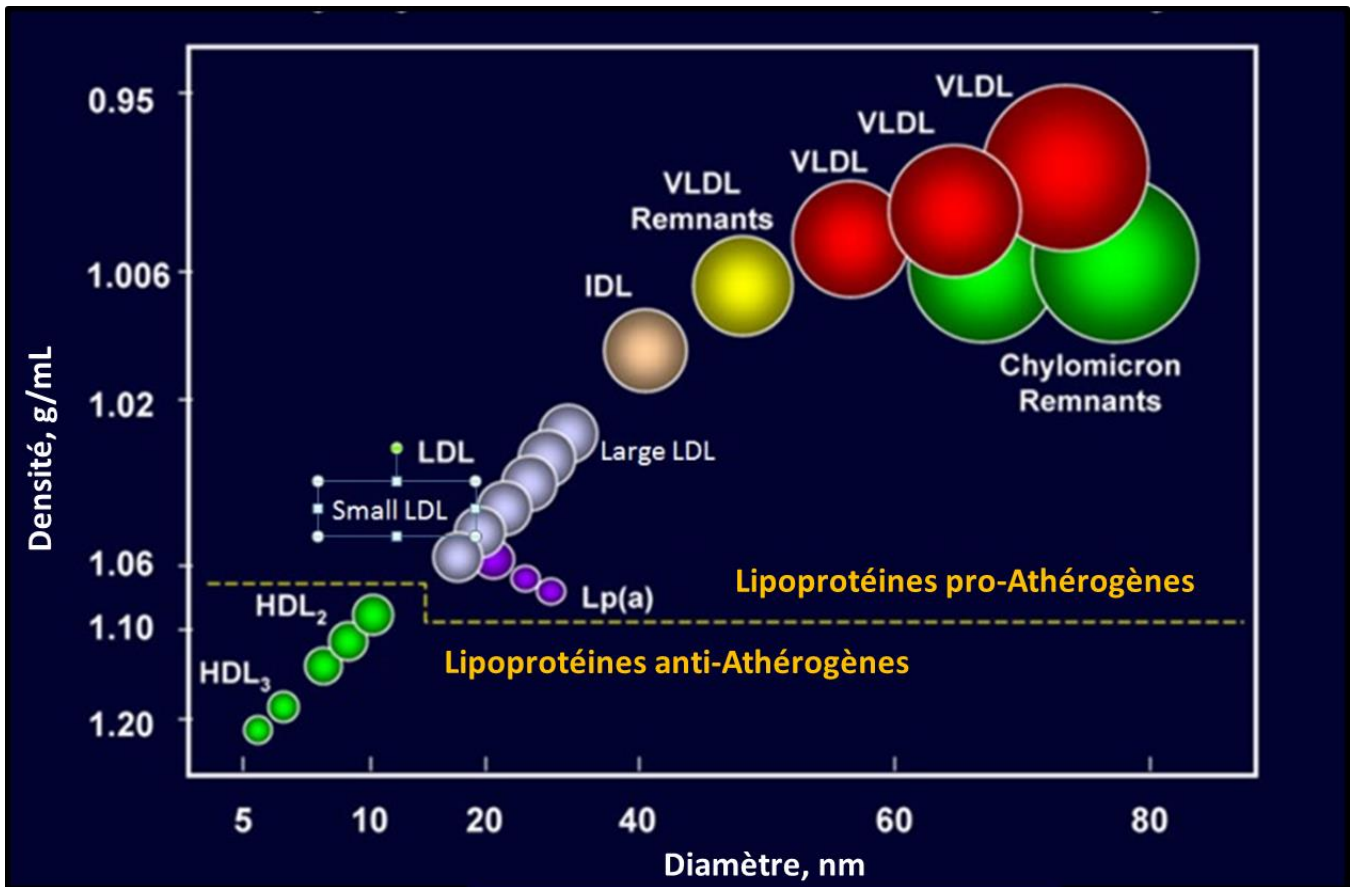


Figure 5 : Schéma d'une lipoprotéine de basse densité (LDL).

Source : adapté de Y. Aizawa et al. 2015 World J Gastroenterol. : « Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism »

Certaines des apolipoprotéines sont ajoutées lors de la synthèse de la lipoprotéine et d'autres sont acquises lors de leur transport dans la circulation sanguine. On distingue plusieurs types de lipoprotéines (voir **Figure 6**) : de la plus grosse à la plus petite on retrouve :

- **Les chylomicrons** : impliqués dans le transport et la distribution des TG absorbés au niveau intestinal, ils sont majoritairement constitués de triglycérides (>80%). Ils possèdent les apolipoprotéines suivantes : ApoA-I, ApoA-II ; ApoB-48, ApoC-I, ApoC-II et ApoC-III. Ils sont synthétisés au niveau des entérocytes à partir de TG et de phospholipides provenant de la digestion. L'absence de l'ApoE et la présence de l'ApoC, implique que ces lipoprotéines ne vont pas être absorbées par le foie¹²⁵ et vont devoir continuer leur trajet dans le système sanguin où elles vont interagir avec une enzyme : la lipoprotéine lipase (ou LPL). La LPL est produite à la surface des cellules cardiaques, musculaires ou adipocytaires, puis sécrétée pour aller se fixer à la surface de l'endothélium le plus proche, où elle joue un rôle crucial dans le métabolisme. Les chylomicrons vont être sécrétés dans la lymphe où ils rejoindront finalement la circulation. C'est à ce moment qu'ils acquièrent l'ApoE et l'ApoC-II qui permet la liaison et l'activation de la LPL. La LPL va hydrolyser une partie des TG du chylomicron en acides gras libres (free fatty acids : FFA), capables de passer la membrane par diffusion passive. Une partie des acides gras sera perdue dans la circulation (« Spill over ») et le reste sera capté par les cellules pour participer au métabolisme énergétique de la cellule via le cycle de Krebs. Au fur et à mesure de son passage dans la circulation, le chylomicron perd une partie de son contenu en TG (transformé en FFA par les cellules) ainsi que certaines de ses apolipoprotéines (ApoCII et ApoA-I qui sont transférées vers les HDL). A ce moment les chylomicrons sont appelés chylomicrons rémanents.
- **Les chylomicrons rémanents** : ils possèdent les apolipoprotéines B48 et E leur permettant d'être recaptés par le foie, où ils vont se fixer grâce à divers récepteurs : le LDL-R ; le LRP et le syndecan-4. Les chylomicrons rémanents sont alors endocytés par l'hépatocyte libérant le reste de ses lipides qui seront stockés puis utilisés dans la voie de la synthèse endogène du cholestérol pour fabriquer les VLDL.
- **Les VLDL** : (very large density lipoprotein) sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Ces particules possèdent les lipoprotéines suivantes : ApoA-V (favorise la lipolyse par la LPL), ApoB100 (protéine de structure et ligand du LDL-R), ApoC-1 (protéine activatrice de la LCAT qui estérifie le cholestérol), ApoC-II et ApoC-III. Elles sont constituées d'environ 50% de tryglycérides et 20% de



Figures 6 : Les différentes sous-classes de lipoprotéines. Les **chylomicrons** sont produits au niveau de l'intestin pour distribuer les lipides d'origine alimentaire. Les **VLDL** sont synthétisées au niveau du foie et sont aussi chargées d'apporter du cholestérol aux tissus. Les **IDL** viennent directement des particules de VLDL et la **LDL** provient des IDL non recapturées au niveau du foie. Avec la diminution en taille et l'enrichissement en cholestérol, les LDL deviennent plus athérogènes.

Source : adapté de Kenneth R Feingold et al. « introduction to Lipids and Lipoproteins, 2000, Endotext.org. Lui-même l'ayant adapté de Advanced Protein Chemistry p45:303, 1994).

phospholipides, le reste étant des apoprotéines, du cholestérol libre et des esters de cholestérol. Les VLDL vont se comporter comme les chylomicrons et aller donner des acides gras aux tissus selon les mêmes mécanismes. Une fois délestée de leurs TG, ces lipoprotéines qui s'appellent maintenant IDL (intermediate-density lipoprotein) vont repartir en direction du foie.

- **Les IDL** : de la même manière que le chylomicron rémanent (son concurrent direct pour la LPL), les IDL se débarrassent peu à peu de ses ApoC. La différence principale avec les chylomicrons est qu'au lieu d'être complètement réabsorbée au niveau du foie, seule une partie des IDL est recyclée au niveau des LDL-R et LRP. Le reste des IDL est hydrolysé à la surface des hépatocytes par une lipoprotéine lipase tissu-spécifique : la lipase hépatique. Cette lipolyse entraîne une diminution drastique du contenu en TG des IDL, et cette modification, couplée à la perte des ApoE, transforme l'IDL en une lipoprotéine appelée LDL.
- **La LDL (Figure 5)** : les LDL (low density lipoprotein) sont les transporteurs majeurs du cholestérol sanguin chez l'Homme. La concentration plasmatique de cette lipoprotéine dépend principalement du rapport entre sa synthèse et sa clairance. Concernant la clairance des LDL, la majorité des LDL est recaptée à la fin de son cycle par le LDL-R et le reste est absorbé par les tissus périphériques. Sa synthèse est elle dépendante de l'activité du LDL-R et du LRP car si leur activité augmente, plus d'IDL sont absorbées par les hépatocytes et donc moins sont converties en LDL. Pour réguler la lipémie par la voie endogène l'organisme joue sur la quantité de LDL-R (soit via la transcription de son ARNm, soit via PCSK9 qui est important dans la dégradation du LDL-R lors de son recyclage) ou sur la synthèse du cholestérol via l'HMG-CoA reductase , une enzyme qui catalyse une réaction limitante dans sa voie de synthèse (c'est la cible des statines). Plusieurs sous-types de LDL ont été caractérisés. De manière simplifiée, on peut distinguer des particules de grosse LDL de faible densité (large buoyant LDL ou lbLDL en anglais) et des petites particules de LDL très denses appelées (small dense LDL ou sdLDL en anglais). Elles ont été découvertes avec l'amélioration des techniques d'étude des lipoprotéines et le consensus actuel différencie deux types de phénotypes en fonction de la quantité relative de sdLDL ou lbLDL¹²⁶. Les patients possédant une forte proportion de sdLDL se retrouvent souvent parmi ceux qui souffrent de maladies métaboliques (hypercholestérolémie¹²⁷, diabète¹²⁸, obésité¹²⁹) et possèdent généralement un taux élevé en TG, moins de HDL-C et une très haute activité de la lipase hépatique¹³⁰. De plus il semble que ces sdLDL soient plus sensibles que les lbLDL à un certain nombre de modifications :
 - a- Oxydation : La preuve est depuis longtemps apportée que l'oxydation des lipoprotéines de LDL joue un rôle important dans leur pathogénicité, *in vitro*¹³¹ via des mécanismes dépendants du calcium et de la mitochondrie¹³² et *in vivo*¹³³. Or

les sdLDL sont plus sensibles à cette modification, probablement du à leur temps de clairance, de rétention tissulaire, et leur composition lipidique¹³⁴. Les sdLDL seraient plus sensibles à l'oxydation, ce qui augmenterait leur affinité pour les protéoglycanes de la paroi endothéliale, ce qui prolonge leur temps de résidence dans la paroi et favorise donc leur oxydation au niveau de la plaque ou de la surface de l'endothélium^{135,136}.

- b- Glycation : les sdLDL semblent plus sensibles à la glycation que les lbLDL¹³⁷.

Au niveau des cellules, les FFA vont être absorbés par diffusion passive puis entrer dans le cycle de β -oxydation des acides gras qui permet de les transformer en acetyl-CoA qui rentre dans le cycle de Krebs et permettra de régénérer l'ATP. Ces transformations font bien sûr intervenir la mitochondrie et ses enzymes.

- **Les HDL** : les HDL (high density lipoprotein) sont des petites lipoprotéines très denses, majoritairement constituées de protéines et possédant très peu de TG (8%). Elles sont synthétisées par le foie et ont un rôle inverse des LDL : leur rôle est de ramener le surplus de cholestérol des tissus vers le foie dans un processus qui s'appelle transport inverse de cholestérol. Les HDL possèdent plusieurs apolipoprotéines : ApoA-I (important dans la reconnaissance du récepteur ABCA-1, SRB-1 et cofacteur de la LCAT qui produit des esters de cholestérol à partir de la lécithine), ApoA-II (inhibe ApoE-II et ApoE-III), ApoC-I,II,III, ApoD et l'ApoE. De faibles taux de HDL-C sont associés à un risque cardiovasculaire plus fort¹³⁸. Les particules de HDL mûrissent au niveau des cellules périphériques en absorbant leur excès de cholestérol via le transporteur ABCA1 et vont le délivrer au foie via le récepteur SRB1 (voie canonique) en échangeant leurs molécules de cholestérol contre des TG avec les LDL ou VLDL (via l'intervention de l'enzyme CETP). Les HDL sont des lipoprotéines considérées comme athéroprotectrices, par leur rôle dans le transport inverse du cholestérol, mais possèdent aussi des fonctions vasodilatatrices, cytoprotectives, anti-inflammatoires, antioxydantes et globalement endothélio-protectrices¹³⁹.

Le métabolisme des lipoprotéines sert à maintenir l'homéostasie énergétique. Elle est dérégulée dans certaines pathologies (hypercholestérolémie familiale, obésité, diabète de type 2) et peut donner lieu à un syndrome métabolique avec une augmentation de VLDL/ LDL circulantes (et favoriser la conversion en petites particules, plus athérogène comme les sdLDL) Lorsque les conditions favorisent la circulation de petites particules athérogènes, elles passent plus facilement la barrière endothéliale et se retrouvent bloquées dans la matrice extracellulaire sous-jacente. Cet événement n'est pas le seul fait d'une concentration plus haute de particules athérogènes mais la combinaison de plusieurs facteurs : inflammation de bas grade, dysfonction endothéliale, etc..

I,3,3°) Développement séquentiel de la plaque d'athérosclérose

Les facteurs de risques cités dans les chapitres précédents provoquent généralement une combinaison de 4 mécanismes physiopathologiques importants :

La dysfonction endothéliale (détaillée dans le chapitre I,3,5) peut être imputable à un état pro-inflammatoire (lipokines, cytokines) de bas grade chronique consécutif à différentes pathologies (ex : diabète, obésité), à des modifications du flux hémodynamique, ou à une hypertryglycémie. Cette dysfonction est le résultat de modifications cellulaires, impliquant un stress mitochondrial et du réticulum endoplasmique, qui va modifier le transcriptome cellulaire, vers un état pro-apoptotique ou vers un état pro-inflammatoire (recrutement des monocytes). Le rôle de l'endothélium dans le tonus vasculaire est aussi perturbé (ex : synthèse de NO)

Les dyslipidémies consécutives à certaines pathologies : elles sont favorisées par une alimentation riche en lipides/sucres et un caractère sédentaire. Elles ont pour conséquence un état déséquilibré de l'homéostasie énergétique, avec une augmentation de la concentration en lipoprotéines pro-athérogènes (et leurs modifications secondaires) et/ou une diminution des lipoprotéines anti-athérogènes. Ce qui a pour conséquence de favoriser le passage de lipoprotéines pro-athérogènes dans l'*intima*.

L'hypertension : imputable à diverses conditions pathologiques, l'hypertension influe sur : « l'adaptation endothéliale », augmente le passage des lipoprotéines pro-athérogènes, et favorise la rupture de plaque.

L'inflammation de bas grade : se traduit par la sécrétion de certaines cytokines qui vont participer à la dysfonction endothéliale, au chimiotactisme des cellules immunitaires (monocytes macrophages) vers la plaque et à la stimulation et prolifération des cellules musculaires lisses.

La plaque d'athérosclérose évolue de différentes manières, probablement à cause de l'interaction entre différents mécanismes physiopathologiques, de la variabilité individuelle (incluant la génétique) et d'expositions à des facteurs environnementaux. Il n'y a donc pas une plaque d'athérosclérose mais un éventail de plaques, dans lequel certaines spécificités seront présentes, ou absentes. Je vais essayer dans ce document d'expliquer succinctement les différents types de plaques, en essayant de suivre l'ordre chronologique de l'athérogenèse.

I,3,3,I,a) L'hyperplasie intimale :

L'hyperplasie intimale consiste principalement en une augmentation de volume de l'intima (**Figure 7E**), avec une invasion de l'intima par des cellules musculaires lisses. Ces cellules musculaires ont subi des modifications phénotypiques qui leur donnent un phénotype sécrétoire et pro-mitotique. Elles vont sécréter plus de matrice extracellulaire. Cette augmentation de volume devient symptomatique dans les stades très tardifs. Elle peut conduire à la sténose partielle ou complète des vaisseaux, ou par des phénomènes d'érosion/cicatrisation elle peut aboutir à la formation de thrombus qui peut provoquer la mort subite du patient par ischémie cardiaque ou cérébrale. Actuellement aucun traitement médicamenteux ne permet de gérer l'hyperplasie intimale, et seuls des inhibiteurs de mTOR (exemple : l'anti-mitotique rapamycine) semble être capable de diminuer la progression¹⁴⁰ de certaines hyperplasies intimales. Les autres méthodes impliquent généralement des actes chirurgicaux (bypass, stent, etc...). Une théorie très intéressante et à contre-courant de la théorie dominante, formulée par le docteur Vladimir M. Subbotin propose¹⁴¹ que l'hyperplasie intimale modérée est un phénomène biologique évolutif normal et que l'hyperplasie intimale excessive est responsable de l'invasion des *vasa vasorum* dans l'intima qui apporteraient les lipoprotéines, non pas à partir du côté luminal de l'intima, mais du côté extérieur, plus proche de la média. Les lipides contenus dans la plaque d'athérome semblent être capables d'augmenter la sécrétion de VEGF-A (un activateur de l'angiogenèse) via l'activation du récepteur nucléaire PPAR- γ (probablement par des mécanismes de prolifération) et joueraient donc un rôle dans l'angiogenèse des *vasa vasorum*¹⁴².

I,3,3,I,b) La strie lipidique (ou Xanthome intimal) :

(du grec *Xantos* : jaune et *-ome* : maladie) : caractérisé par un jaunissement de la paroi artérielle (**Figure 7B**) dû au passage de lipoprotéines dans l'espace intimal. Ici la théorie dominante propose une entrée des lipoprotéines au travers de l'endothélium vasculaire.

Trois mécanismes ont été envisagés pour en rendre compte :

- le premier est un transport vésiculaire au sein même de la cellule endothéliale par endocytose avec un rôle apparemment majeur du récepteur éboueur SR-B1 mis en évidence par les expériences d'Armstrong *et al.*¹⁴³ et aussi par des mécanismes dépendants de la cavéoline-1¹⁴⁴
- le second est un passage paraendothélial, ce qui nécessite un passage entre les jonctions serrées (comme les monocytes le font).

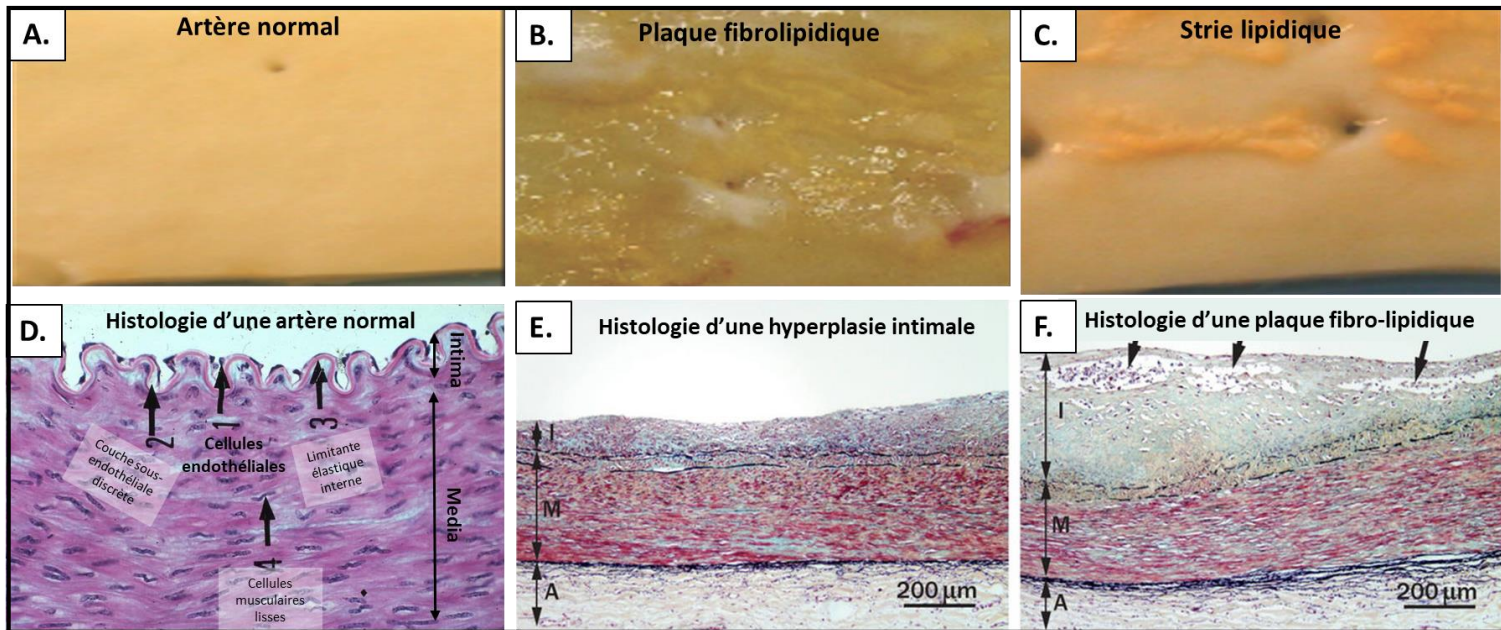


Figure 7 : Lésions de pré-athérome.

L'hyperplasie intimale consiste en une augmentation du volume de l'intima due à une hyperplasie des cellules musculaires lisses et une augmentation de la synthèse de matrice extracellulaire (B), visible au niveau histologique (E), avec une nette accumulation de collagène (en bleu/vert) par comparaison avec l'artère saine (D). Les stries lipidiques sont caractérisées par l'infiltration de lipoprotéines dans l'intima (C) qui sont prises en charge par des cellules capables de les phagocyter (voir coupe histologique F : flèches noires = cellules spumeuses) .

Source: **A-C** : remerciement au Dr Olivier Meilhac pour le partage de sa collection photographique de physiopathologie d'artère.

D : Adapté de Thibault, G. Vincke, E. Depiereux et M. Raes : Atlas d'histologie Humaine et animal. « <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/> »

E et F : modifier de F. Otsuka et al. "Clinical classification of plaque morphology in coronary disease" published in nature reviews cardiology 29 april 2014.

- le troisième est un passage à travers des « jonctions de fuite » (« *leaking junction* » en anglais) qui apparaissent lors de l'apoptose ou de la mitose des cellules endothéliales. Cette dernière hypothèse proposée par L. Tarbel et J. Cancel^{145,146} explique probablement le passage des LDL qui apparaît après l'établissement de la dysfonction endothéliale. Cette équipe propose que le transport transendothélial est négligeable dans ce processus d'accumulation de lipoprotéines¹⁴⁷. On peut noter que certaines équipes ont aussi observé une retraction des cellules endothéliales en réponse aux LDL oxydées, dépendante d'une modulation du cytosquelette qui pourrait aussi expliquer ce type de passage¹⁴⁸.

Ces lipoprotéines (principalement des sdLDL ou LDL, avec quelques IDL et VLDL rémanent) vont se retrouver piégées dans la matrice de protéoglycanes¹⁴⁹ présente sous les cellules endothéliales. Ces lipoprotéines peuvent être recapturées par différents type cellulaires via l'interaction avec des récepteurs membranaires. Le cholestérol est en général efflué par le transport inverse associé aux HDL via les transporteurs ABCA-1. Dans le cas où les LDL sont modifiées (glycation ou oxydation), elles acquièrent la capacité d'être reconnues par des récepteurs éboueurs (« scavenger receptor » en anglais) dont on peut voir les plus importants dans le **tableau 4**.

Une fois internalisées les LDL vont être transportées jusqu'aux endosomes où elles rejoindront des lysosomes, en vue d'une dégradation. Le cholestérol sera estérifié par l'ACAT-A1 qui formera de petites gouttelettes d'ester de cholestérol, qui peuvent fusionner pour faire de grosses gouttelette lipidiques visibles au microscope et qui ont donné le nom de cellules spumeuses aux macrophages remplis de ces gouttelettes (voir **Figure 8**).

Ces esters de cholestérol peuvent suivre le chemin inverse jusqu'au cholestérol libre utilisable pour produire de l'Acyl-CoA utilisable par la mitochondrie pour régénérer de l'ATP via la β -oxydation. Ils peuvent aussi être efflués via la voie du transport inverse du cholestérol par les HDL (voir chapitre précédent).

Lorsque le système de captation classique des LDL est saturé, leur temps de rétention dans la matric extracellulaire augmente, ce qui favorise leur oxydation et leur phagocytose par les cellules via les récepteurs éboueurs (LOX-1 notamment). A partir d'une certaine concentration et d'un certain taux d'oxydation, les LDL oxydées sont toxiques pour les cellules et induisent leur apoptose, par des mécanismes encore mal compris, qui seront traités plus en détail dans le chapitre sur le « stress oxydant et la dysfonction endothéliale ».

Tableau 3 : Principaux récepteurs importants pour l'efflux des lipoprotéines		
Nom du Récepteur	Type cellulaire	ligand
LDL-R	tous	LDL natives
LOX-1 ¹⁵⁰ .	Cellules endothéliales, Cellules musculaires lisses, Macrophages	lipoprotéines modifiées
CD36 (ou SCARB3 de la famille des récepteurs SR)	Adipocytes, monocytes, plaquettes, cellules endothéliales microvasculaires	lipoprotéines modifiées
famille des scavenger receptor (SR-A1,2,3 et SR B1,2,3)	Principalement les macrophages	lipoprotéines modifiées

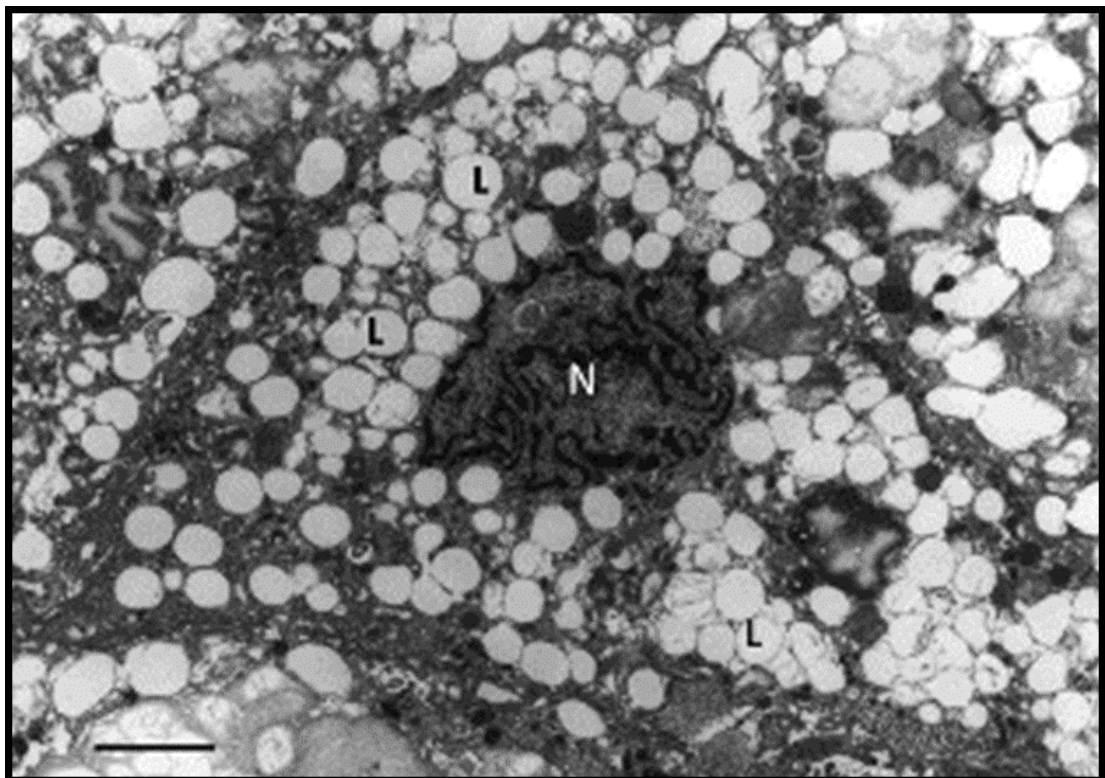


Figure 8 : Morphologie d'une cellule spumeuse

Accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme d'une cellule spumeuse au sein d'une plaque d'athérosclérose d'aorte humaine (microscopie électronique à transmission).

N = noyaux ; L = gouttelette lipidique.

Source : DA Chistiakov, YV Bobryshev, AN Orekhov. *Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. Published in 2016 in J Cell Mol Med.*

L'oxydation des lipoprotéines sera aussi présentée au chapitre « oxydation des lipoprotéines ». Une version illustrée du devenir du LDL-cholestérol dans la plaque d'athérome est proposée dans la **Figure 9**. Enfin, l'accumulation de lipoprotéines dans l'espace extracellulaire va former petit à petit le cœur nécrotico-lipidique caractéristique de l'athérome.

I,3,3,2) L'athérome

L'athérome est la forme aggravée de la strie lipidique. A la différence du Xanthome, l'athérome possède un cœur lipidique constitué de lipoprotéines et de cellules spumeuses, ainsi qu'une chappe fibreuse constituée de cellules musculaires lisses et de nombreuses fibres de collagène ainsi que d'autres fibres composant la matrice extracellulaire¹⁵¹. Au sein du cœur lipidique, on retrouve des cellules spumeuses qui ont phagocyté de nombreuses lipoprotéines et possèdent un cytoplasme rempli de gouttelettes lipidiques.

Ces cellules finissent en général par mourir (apoptose puis nécrose post-apoptotique) et former le cœur nécrotico-lipidique (voir **figure 10**). Ce mécanisme sera traité plus en détail dans le chapitre « cellules spumeuses et cœur nécrotico-lipidique ». La chappe fibreuse joue un rôle protecteur pour éviter la rupture de la plaque^{152,153}. Une illustration des différences histologiques entre la strie lipidique et l'athérome avancé est proposée en **figure 11**.

I,3,3,3°) La plaque d'athérosclérose :

L'athérosclérose est une complication possible de l'athérome : la matrice extracellulaire est modifiée par l'apparition de cristaux d'hydroxyapatite qui solidifient la matrice de manière inégale. Ces modifications de la matrice extracellulaire de la chappe fibreuse la déstabilisent, augmentant les risques de rupture de la plaque¹⁵⁴. Les théories initiales proposaient qu'un excès dans la concentration des ions calcium et phosphate dans les fluides tissulaires, menait à leur précipitation/cristallisation au sein du tissu. Cependant, les découvertes de ces dernières années ont permis de comprendre que ces formations cristallines étaient régulées *in situ* par les cellules musculaires lisses et les macrophages¹⁵⁵. La théorie actuelle propose que ces changements de phénotype (contractile vers sécrétoire) soit à l'origine de modifications épigénétiques de ces cellules résidentes, en réponse aux espèces réactives de l'oxygène, présentes en grandes quantités dans la plaque (comme le peroxyde d'hydrogène), leur donnerait un phénotype ostéoblastique^{156,157}.

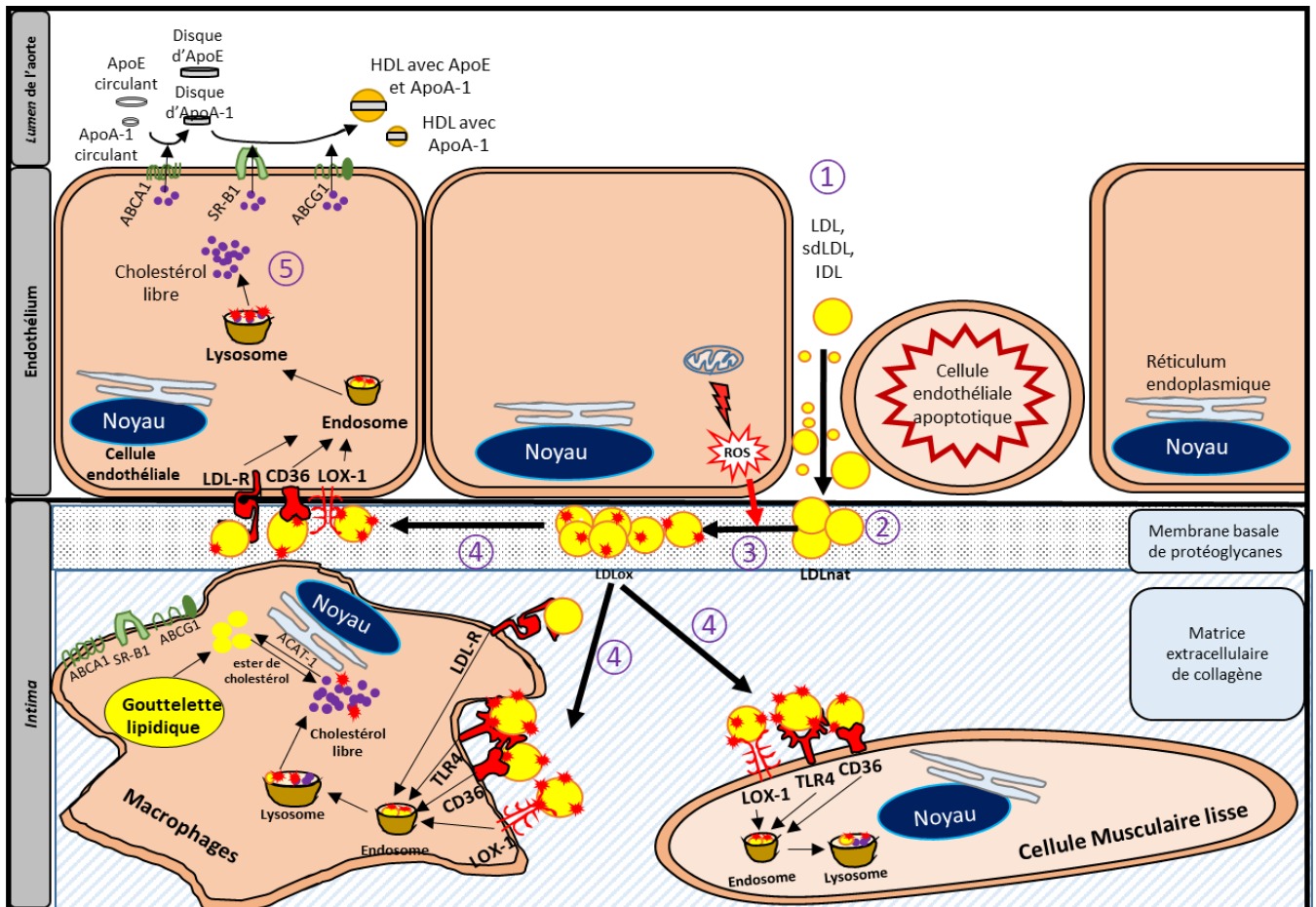


Figure 9 : Devenir du LDL-cholestérol dans l'endothélium.

Les LDL passent vers l'intima au niveau de l'endothélium endommagé ①, se retrouvent piégées dans la matrice de protéoglycans ②, puis peuvent être oxydées par les espèces réactives de l'oxygène, produites par les cellules endothéliales ③. Les LDLox seront alors reconnus par des récepteurs éboueurs (TLR-4/CD36/LOX-1) ou le LDL-R (pour les LDL natives ou minimalement oxydées) ④. Le cholestérol est récupéré par les HDL via le transport inverse du cholestérol (ABCA-1/SR-B1/ABCG1) ⑤. La strie lipidique se développe quand le système n'est plus à l'équilibre. Les LDL vont alors s'accumuler dans l'intima et dans les cellules sumeuses.

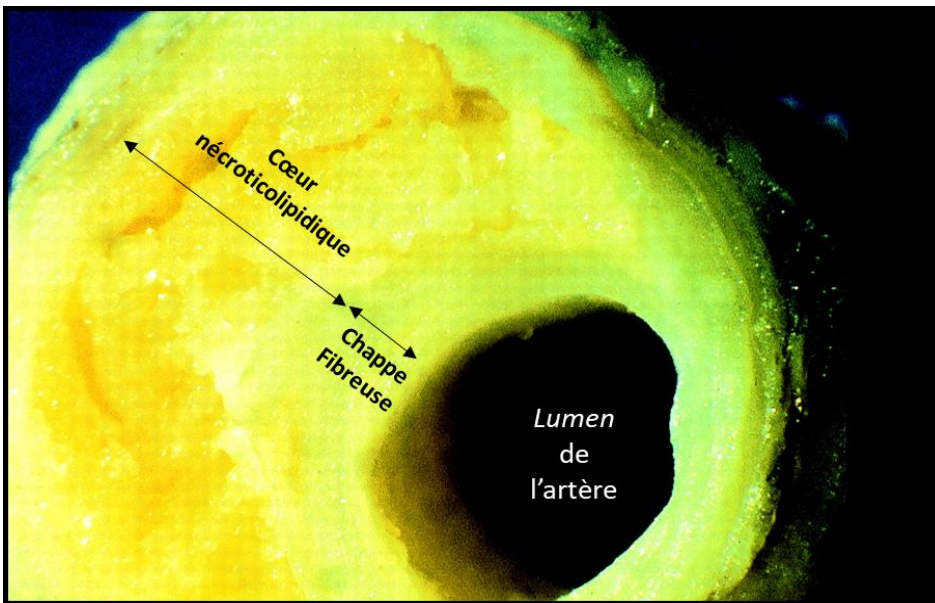


Figure 10 : Photo macroscopique d'une plaque d'athérome dans une artère coronaire humaine.

On peut observer le cœur très lipidique et l'épaississement intimal.

Source : Modifié de : Michael J. Davies, « the pathophysiology of acute coronary syndromes » published in *Heart (BMJ journals)* Volume 83, issue 3.

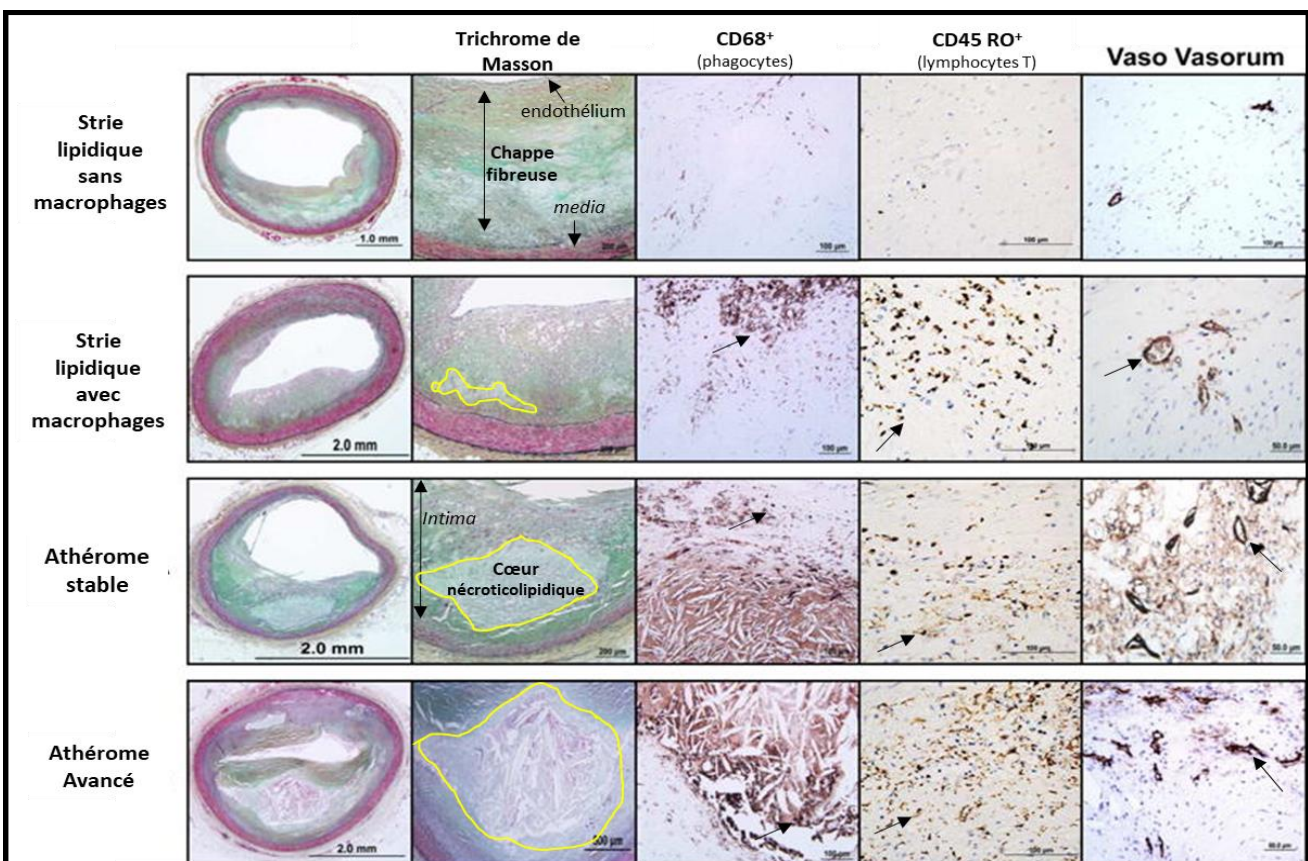


Figure 11 : Progression de la strie lipidique vers l'athérome. Le volume de la chappe fibreuse augmente avec la progression de la plaque, mais diminue dans les athéromes avancés dû à l'action des métalloprotéinases matricielles. Les cellules inflammatoires sont recrutées dans la plaque et sont plus nombreuses dans les plaques instables. Enfin, l'apparition de *vasa vasorum* est observable dans les athéromes stables et dans les plaques d'athérome avancé, mais leur structure est moins mature.

Source : Modifié et Adapté de : Otsuka, Fumiuyuki et al. "Natural Progression of Atherosclerosis from Pathologic Intimal Thickening to Late Fibroatheroma in Human Coronary Arteries: A Pathology Study." *Atherosclerosis* 241.2 (2015): 772-782. PMC. Web. 14 Sept. 2017.

I,3,3,4°) Modification de l'athérome : hémorragie intraplaque

L'hémorragie intraplaque est un risque associé à la néovascularisation que l'on peut observer dès le stade strie lipidique¹⁵⁸ et qui est en général plus important dans les lésions fibroathéromateuses¹⁵⁹. Dans ces plaques, la néo-vascularisation correspond à une invasion de l'intima par les *vasa vasorum* de l'*adventice*. Il est théorisé que la néoangiogenèse des *vasa vasorum* soit dépendante de signaux hypoxiques (HIF1 α et VEGF) qui augmentent dans la paroi artérielle, notamment dans le cas d'hypertension (chez le rat)¹⁶⁰, d'hypercholestérolémie (chez le porc)¹⁶¹, de l'hypertrophie de l'*intima*¹⁶² ou avec la présence de lipides dans la plaque¹⁴². La majorité de ces *vasa vasorum* (80%) est structurellement imparfaite¹⁶³, ce qui pourrait expliquer la « fuite » des lipoprotéines et des érythrocytes de cette circulation vers l'*intima*. La fuite des érythrocytes dans la plaque d'athérome est un facteur aggravant¹⁶⁴. Une fois dans l'intima, les érythrocytes vont être phagocytés par les cellules musculaires lisses, les macrophages et les cellules endothéliales des *vasa vasorum*¹⁶⁵, qui vont ensuite les démanteler dans les phagolysosomes. Pour commencer, les érythrocytes sont constitués à hauteur de 40% de lipides, ce qui participe significativement à la formation du cœur nécrotico-lipidique, et de cristaux de cholestérol¹⁶⁶; de plus la lyse des érythrocytes libère leur cœur d'hémoglobine qui va réagir avec les lipoprotéines pour libérer du Fe³⁺. Ce dernier est très réactif et sera capable de catalyser l'oxydation de nouvelles lipoprotéines, participant à l'accumulation de LDL oxydées toxiques pour les cellules de l'*intima*.

Il est possible que la rupture d'un ou plusieurs *vasa vasorum* produise une hémorragie intraplaque, qui augmente alors brusquement en volume et peut entraîner la rupture de la chappe fibreuse si elle est suffisamment fine.

I,3,3,5°) Complication de l'athérome : formation de thrombus

Deux mécanismes de formation du thrombus existent en fonction du type de plaque (stable ou non) : le premier est dû à la rupture de la plaque qui met en contact le cœur nécro-lipidique avec la circulation : le facteur tissulaire (présent en grande quantité dans les macrophages et les cellules musculaires lisses), capable de cliver la pro-thrombine en thrombine, qui ensuite va cliver le fibrinogène en fibrine. De plus, la transglutaminase FXIII, va permettre de lier entre elles les fibres de fibrine formant une structure tridimensionnelle capable de retenir les plaquettes et donc de former le thrombus. Enfin, les plaquettes s'activent au contact du collagène présent dans la matrice extra-cellulaire sous-endothéliale et contenu au cœur de la plaque. Ce premier mécanisme implique la rupture de la plaque et on le retrouve donc généralement dans les plaques avec une fine chappe fibreuse (plaque instable, **voir figure 12 A**). L'autre manière de former le

thrombus passe par l'érosion de barrière endothéliale (cellules + membrane basale), qui conduit à un thrombus superficiel luminal (**Voir figure 12 B**).

La présence d'une chappe fibreuse épaisse rigidifie le vaisseau et la sténose qui s'installe induit une perturbation du flux hémodynamique, qui joue un rôle important dans la formation du thrombus d'érosion. Les stress mécaniques induits par les perturbations hémodynamiques et la dysfonction endothéliale vont favoriser l'apoptose des cellules endothéliales et/ou leur détachement (anoïkis) ce qui va exposer la membrane basale et favoriser l'agrégation des plaquettes¹⁶⁷. Le thrombus se développe alors pendant plusieurs jours sur cette zone et va provoquer une sténose (généralement incomplète) de l'artère. Des petits morceaux de thrombus peuvent ensuite se détacher et aller obstruer des vaisseaux de plus petit calibre entraînant l'ischémie des tissus en aval (embolisation). Généralement, les thrombus dus à une rupture de plaque sont associés à une morbidité (syndrome coronarien aigu) plus élevée que les thrombus résultant d'une érosion endothéliale¹⁶⁸.

Le thrombus final contient généralement dans l'ordre d'abondance : la matrice de fibrine, des érythrocytes, des plaquettes et quelques cellules immunitaires. On peut néanmoins préciser que le thrombus lié à une érosion est plus riche en cellules immunitaires (leucocytes) et que celui lié à une rupture de plaque est plus riche en plaquettes et érythrocytes (il se forme aussi beaucoup plus rapidement)¹⁶⁸.

I,3,3,6°) Symptômes clinique découlant de l'athérosclérose

La cause principale des symptômes qui découlent de l'athérosclérose est l'ischémie. Elle peut soit être partielle et entraîner un angor stable (fatigue chronique et douleur cardiaque), soit être totale et entraîner différentes symptômes en fonction de la localisation et de la durée de l'ischémie. Les mécanismes qui conduisent à l'ischémie partielle sont : l'augmentation de l'épaisseur de l'intima due à la plaque et parfois la formation du thrombus. L'ischémie totale est soit due à une augmentation brusque du volume de la plaque (ex : hémorragie intraplaque) soit due à la formation (ou au détachement) de thrombus. Ce thrombus lui-même étant formé par l'érosion de l'endothélium ou la rupture de la plaque, avec libération de son contenu thrombogène.

L'ischémie va entraîner la nécrose des tissus en aval par déprivation énergétique (déprivation en oxygène et en sucre/lipoprotéines). Les conséquences de l'ischémie sont variables selon la taille et la localisation de la zone ischémisée. Lorsqu'elle touche une artère coronaire, elle peut bloquer la circulation, provoquant l'infarctus du myocarde et la mort du patient si il n'est pas pris en

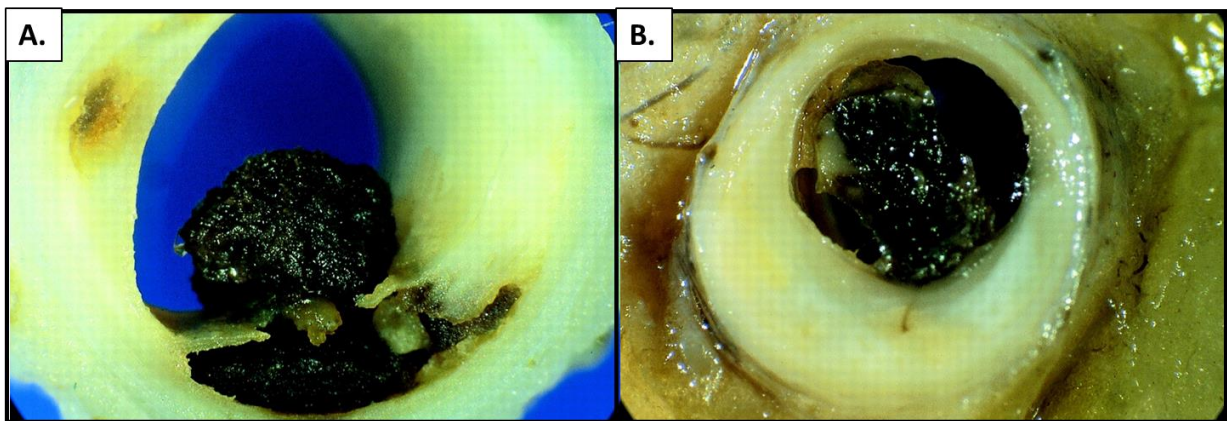


Figure 12 : Formation d'un thrombus luminal dans des artères coronaires humaines. Photo de thrombus dû à la rupture d'une plaque d'athérome à chape fine (A) ou dû à une érosion de l'endothélium (B).

Source : Modifié de : Michael J. Davies, « the pathophysiology of acute coronary syndromes » published in Heart (BMJ journals) Volume 83, issue 3.

charge très rapidement. Au niveau cérébral, une embolie (thrombus occlusif apporté par la circulation) ou la formation d'un thrombus *in situ* peut avoir pour conséquence la mort du patient, ou dans des cas moins graves, des séquelles plus ou moins importantes en fonction de la zone touchée. Enfin le caillot peut toucher les artères des membres inférieurs provoquant douleur intense, perte de fonction et nécrose relativement rapide (environ 6h) des tissus en aval pouvant mener à des symptômes de claudication voire jusqu'à l'amputation.

Il convient finalement de parler des cas d'anévrisme. L'anévrisme correspond à la rupture d'un vaisseau fragilisé, notamment par des plaques d'athérosclérose, et principalement les plaques instables, avec un cœur nécroticolipidique important et une chappe fibreuse fine¹⁶⁹. Dans l'anévrisme, la pression sanguine devient supérieure à la résistance du vaisseau. Ce qui provoque le gonflement du vaisseau via l'accumulation de sang dans la zone de moindre résistance et peut conduire à la rupture du vaisseau, provoquant alors l'hémorragie interne et les symptômes hémorragiques (choc hypovolémique jusqu'à l'évanouissement voire la mort) et la défaillance des organes touchés.

I,3,4°) Acteurs vasculaires impliqués dans la pathologie

I,3,4,1°) Cellules endothéliales et dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale est historiquement définie comme une anomalie de sécrétion de NO (monoxyde d'azote, médiateur moléculaire qui permet, entre autres, la relaxation des muscles lisses). Cependant en l'état des connaissances actuelles cette vision est incomplète. La dysfonction endothéliale est caractérisée par une série de modifications allant de l'expression de molécules pro-inflammatoires et favorisant le recrutement de leucocytes, la diminution de la sécrétion de NO et d'agents hémostatiques pour aller jusqu'à l'apoptose de ces cellules.

Plusieurs facteurs favorisent le déclenchement de la dysfonction endothéliale comme par exemple le stress hémodynamique¹⁷⁰, l'hyperglycémie¹⁷¹, l'obésité¹⁷², les dyslipidémies¹⁷³, l'inflammation chronique¹⁷⁴, le tabagisme¹⁷⁵, et les lipoprotéines ou lipides oxydés¹⁷⁶.

- ***Dysfonction endothéliale et monoxyde d'azote***

L'endothélium joue un rôle important dans l'adaptation des vaisseaux aux changements de pression : en réponse à l'augmentation locale de la pression sanguine sur la paroi, l'endothélium va augmenter sa synthèse de NO¹⁷⁷ et de prostacycline (antithrombotique et vasodilatateur) ce qui va permettre la vasorelaxation du vaisseau par son effet sur les cellules musculaires lisses. En dehors de son rôle vasodilatateur, le NO diminue aussi l'activation plaquettaire¹⁷⁸, régule négativement la division des cellules musculaires lisses¹⁷⁹ et participe à la régulation du chimiotactisme et à l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales¹⁸⁰.

La notion de biodisponibilité du NO est importante dans le cadre de la dysfonction endothéliale. En effet, le NO peut réagir avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) pour former le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$) un agent pro-oxydant et cytotoxique. En condition de stress oxydant, la mitochondrie augmente la synthèse d'anion superoxyde, ce qui diminue la quantité de NO biodisponible et produit du peroxynitrite¹⁸¹. De plus ce peroxynitrite peut soit être protoné ($ONOOH$), soit réagir avec le CO_2 formant le nitroso-peroxycarboxylate ($ONOOCO_2$), qui peuvent tous les deux induire la nitrosylation des protéines et les inactiver¹⁸². Pour compenser, la cellule dispose de mécanismes de défense antioxydants innés, sous la forme d'enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase etc... qui sont régulés positivement dans les plaques jeunes, pour contrebalancer l'augmentation du stress oxydant, mais dont la synthèse diminue dans les plaques avancées¹⁸³

La diminution de la biodisponibilité du NO va donc diminuer les capacités vasodilatatrices du vaisseau et favoriser :

- la formation de thrombus via la perte de l'effet inhibiteur sur les plaquettes,
- la division des cellules musculaires lisses
- le recrutement des monocytes.

De plus, la formation de peroxynitrite peut entraîner l'apoptose des cellules endothéliales via la voie du stress du réticulum¹⁸⁴, ce qui participe à l'entrée de lipoprotéines dans l'intima par des jonctions de fuite et à la formation du thrombus.

- ***Dysfonction endothéliale et recrutement des monocytes***

En fonction de la nature du stimulus pro-inflammatoire, la cellule endothéliale peut s'activer transitoirement et faiblement (aussi appelé réponse de type I ¹⁸⁵) ou bien subir des changements plus radicaux en réponse à la présence de DAMP et PAMP (motifs moléculaires liés aux dégâts cellulaires ou aux pathogènes reconnus par le système immunitaire), des cytokines (IL-1, TNF- α , interféron- γ) ou des LDL oxydées¹⁸⁶. Cette réponse de type II est caractérisée par une activation de la voie NF κ B¹⁸⁷ qui permet la sécrétion de molécules chimiotactiques qui attirent les monocytes (via MCP-1 et IL-8), l'expression de molécules d'adhésion pour ces même monocytes (VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine). Ces modifications phénotypiques de l'endothélium sont focales, localisées au niveau des plaques d'athérome *in vivo*¹⁸⁸ et ont une relevance physiopathologique car les KO VCAM-1 sont athéroprotecteurs dans les modèles murin¹⁸⁹

- ***Dysfonction endothéliale et stress hémodynamique***

Les variations de flux hémodynamiques sont capables d'activer la cellule par divers mécanismes impliquant des canaux ioniques, des intégrines, des récepteurs à activité tyrosine kinase et des

récepteurs couplés aux protéines G. D'autres régions spécialisées de la membrane plasmique participent aussi à la signalisation comme par exemple le glycocalix, les jonctions GAP etc...¹⁷⁰.

Concernant l'athérosclérose, nous avons déjà vu précédemment que le flux hémodynamique est laminaire par endroits et perturbé dans les zones d'embranchement, les courbures, et localement au niveau des plaques d'athérosclérose. La force la plus importante et la plus étudiée est la contrainte de cisaillement, il s'agit des forces appliquées parallèlement à la paroi vasculaire par l'écoulement sanguin. Le taux de cisaillement est le gradient de vitesse sanguine proche de la paroi vasculaire.. Il est maintenant admis que les plaques d'athérosclérose se développent préférentiellement là où les contraintes de cisaillement sont les plus faibles, permettant une meilleure pénétration des LDL. La présence de flux laminaire change radicalement le phénotype de cellules endothéliales en culture par des mécanismes dépendants du calcium¹⁹⁰ et de l'augmentation de eNOS¹⁹¹ qui joue un rôle protecteur crucial contre la dysfonction endothéliale via l'augmentation de la synthèse de NO. Les signaux extracellulaires sont convertis par les mécanorécepteurs, l'intégration cellulaire du signal passe par les facteurs de transcription ce qui aboutit à une répression de la synthèse de gènes pro-inflammatoires (MCP-1, VCAM-1), et à une augmentation des défenses antioxydantes (SOD-2), mais aussi des facteurs anti-thrombotiques (prostacycline), ainsi qu'un phénotype anti-apoptotique et anti-prolifératif (dépendant de Nrf-2 et Klf)¹²³.

- ***Dysfonction endothéliale et perméabilité au LDL.***

Les LDL sont capables de traverser la barrière endothéliale par un passage transendothélial¹⁴³ au début de la pathologie, ou une fois que la dysfonction endothéliale est amorcée, par des jonctions de fuite.

Différents mécanismes sont responsables de la perméabilisation de la barrière endothéliale : tout d'abord la présence d'un glycocalix existant à la surface apicale des cellules endothéliales *in vivo* (voir **figure 13**) et qui joue un rôle dans l'imperméabilité des cellules endothéliales aux molécules de haut poids moléculaire (comme l'albumine) ainsi qu'aux monocytes et érythrocytes ¹⁹². L'étude de Daniel R. Potter et Edward R. Damiano¹⁹³ semble montrer que les cellules en culture ne synthétisent pas naturellement le glycocalix retrouvé *in vivo*, et qu'elles ont besoin de l'ajout d'un flux laminaire pour sécréter ce glycocalix, ce qui reste encore débattu au sein de la communauté scientifique¹⁹⁴. De plus, les études chez les souris ont montré que le glycocalix est plus fin dans les zones de turbulence hémodynamique, et que l'accumulation intimale des LDL¹⁹⁵ double ou triple.

En plus du glycocalix, les cellules endothéliales possèdent des jonctions adhérentes (ex VE-cadherin) et des jonctions serrées (claudines et occludines) qui limitent les échanges de soluté et de macromolécules (rôle de barrière). Le passage des monocytes entre les cellules endothéliales requiert l'interaction de plusieurs molécules entre les cellules ainsi que certaines enzymes

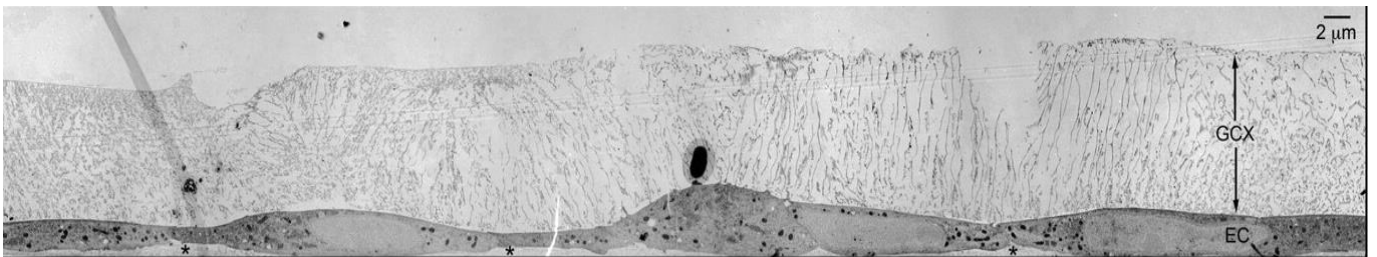


Figure 13 : Photo en microscopie électronique à transmission du glycocalix (GCX) à la surface de cellules aortiques bovines en primo culture (EC).

Image modifiée de : Imaging the Endothelial Glycocalyx In Vitro by Rapid Freezing/Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy . Eno E. Ebong, Frank P. Macaluso, David C. Spray and John M. Tarbell Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011;31:1908-1915, originally published July 20, 2011

capables de lyser certaines des protéines d'adhésion. Ce mécanisme est régulé par des signaux qui induisent la transcription de certains gènes et ne se déclenche que dans les zones d'adhérence entre monocytes et cellules endothéliales. Les LDL peuvent passer par transcytose au travers des cellules endothéliales¹⁴³ ou lors de la dysfonction endothéliale, par des jonctions de fuite au niveau des cellules apoptotiques^{196,146,148}. De nombreuses études chez les animaux modèles^{197,198} et sur des modèles cellulaires^{148,199} ont montré que les LDL modifiées (oxydées par exemple) ou les sous-produits d'oxydation des lipides sont capables d'augmenter la perméabilité de la barrière endothéliale. Certains antioxydants¹⁹⁹ et certaines hormones (notamment le 17- β oestradiol²⁰⁰ présent chez la femme) semblent être capables de diminuer et de normaliser la perméabilité endothéliale, probablement en protégeant les cellules endothéliales des effets des LDLox.

En résumé, la dysfonction endothéliale correspond à l'altération de plusieurs fonctions de l'endothélium sain, à savoir son rôle dans la régulation du tonus vasculaire, son rôle anti-thrombotique et sa fonction de barrière. Plusieurs facteurs physiologiques (flux laminaire perturbé, vieillissement²⁰¹ etc) et des facteurs externes (diabète, dyslipidémie etc...) participent à l'ammorçage et l'entretien de la dysfonction endothéliale. Cette dysfonction joue un rôle fondamental dans la formation de plaques d'athérome, car elle provoque l'augmentation de l'influx de lipoprotéine (perte de son rôle de barrière perméable), de monocytes (augmentation des molécules d'adhésion, perte du glycocalix), favorise le changement phénotypique des cellules musculaires lisses et est propice à la formation du thrombus. Les LDL oxydées ont la capacité d'induire un fort stress oxydant dans les cellules endothéliales, suffisant pour provoquer certains aspects de la dysfonction endothéliale. A l'inverse, la dysfonction endothéliale, par l'augmentation de la perméabilité au LDL et l'augmentation de sa production de ROS²⁰² joue un rôle dans l'oxydation de ces lipoprotéines dans l'espace intimal. Ces mécanismes seront traités dans le chapitre « Stress oxydant et dysfonction endothéliale ».

I,3,4,2°) Cellules Spumeuses et cœur nécrotico-lipidique.

Les cellules spumeuses sont des cellules retrouvées au sein de la plaque caractérisées par un cytoplasme rempli de gouttellettes lipidiques. L'origine des cellules spumeuses est encore un phénomène mal compris. En effet, Dans les années 1970/80, deux courants théoriques s'affrontaient pour décrire la plaque d'athérosclérose, le premier prenant compte de la multiplication des cellules musculaires lisses proposait que l'athérosclérose soit une réponse tissulaire à un stress extérieur, et le deuxième courant proposait un rôle majoritaire de l'inflammation dans l'athérosclérose. Ross Guerrity²⁰³ montre en 1979 par des études chez le porc que les monocytes circulants, mais pas les autres leucocytes, sont capables d'envahir la plaque et de se transformer en cellules spumeuse²⁰⁴. Ces expériences écartent les théories de Altschul qui

proposait en 1950 comme origine des cellules spumeuses le détachement et la migration des cellules musculaires lisses. Pourtant la présence de cellules musculaires lisses spumeuses et leur capacité à endocyter des LDL^{205,206} avait été largement démontrée. Un des facteurs de confusion principal est la technique utilisée pour marquer les macrophages, en utilisant le marqueur de surface CD68. La découverte de cellules musculaires lisses présentes dans les lésions riches en lipides, et qui exprimaient aussi le CD68²⁰⁷ a amené à repenser la manière dont on étudiait les macrophages spumeux, et jette le doute sur certaines publications qui n'utilisaient que le CD68 comme marqueur des macrophages spumeux. Ce débat reste important à l'heure actuelle, malgré le développement de plusieurs techniques de co-marquage et une partie de la communauté reste néanmoins sceptique²⁰⁸. Certaines preuves expérimentales semblent montrer la présence de cellules musculaires lisses au stade pré-athérome²⁰⁹, et qu'elles seraient déjà partiellement modifiées à ce stade²¹⁰. De plus, les amas lipidiques amorçant le cœur nécrotico-lipidique ont tendance à se retrouver agrégés au plus profond de l'*intima*²¹¹, donc proche des cellules musculaires lisses mais éloignées des macrophages, qui eux sont plus proches de l'endothélium dans les stades précoces de l'athérome²¹². Les cellules musculaires lisses de la media assurent un rôle contractile pour assurer le tonus vasculaire, mais il garde la possibilité de modifier son phénotype en réponse à des stimuli extérieurs²¹³. Enfin ce switch phénotypique des cellules musculaires lisses vers un phénotype sécrétoire, pro-mitotique et pro-inflammatoire semble lié à un cocktail de facteurs incluant des cytokines (TGF- β et PDGF- β)^{214,215}, et l'accumulation de lipides modifiés²¹³. Une fois activées, les cellules musculaires lisses sont capables d'exprimer un certain nombre de récepteurs éboueurs, et des marqueurs de macrophages, et ils deviennent alors capables de phagocyter des LDL oxydées, et d'avoir une morphologie de cellule spumeuse²¹⁶. Cependant, la population de cellules musculaires lisses formant des cellules spumeuses ne représenterait que 50% des cellules spumeuses dans les plaques intermédiaires²¹⁷ et au mieux 36% dans les plaques avancées (dans le modèle animal)²¹⁸. Enfin, il est important de noter que ces cellules musculaires ont une activité de phagocytose et d'efferocytose inférieure aux macrophages²¹⁶, ce qui montre bien qu'il ne s'agit pas là d'une transdifférenciation totale en macrophage, mais bien d'une plasticité.

Les macrophages spumeux ont pour origine les monocytes de la circulation. En réponse au dysfonctionnement de l'endothélium, les monocytes sont recrutés au niveau de la plaque par des récepteurs (ICAM/ VCAM) présents à la surface des cellules endothéliales. Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose, et jouent un rôle important dans l'élimination de l'excès de cholestérol dans l'*intima*. Ils expriment faiblement le récepteur aux LDL natives cependant ils expriment plusieurs récepteurs éboueurs capables d'ingérer les LDL modifiées (les plus importants étant LOX-1, CD36 et SR-A1). Goldstein et Brown ont montré en 1977 que les LDL acétylées (une modification chimique artificielle qui n'est pas retrouvée *in vivo*) étaient avidement phagocytés par les macrophages²¹⁹. Cependant, d'autres types de modifications existent *in vivo*

(que nous traiterons dans le chapitre oxydation des LDL), avec un accent mis sur l'oxydation des lipides formant des produits de peroxydation comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui peuvent être reconnus par les récepteurs éboueurs et phagocytés par les macrophages²²⁰. Les LDL se retrouvent ensuite dans l'endosome où ils seront métabolisés en acides gras libres et cholestérol libre avant d'être stockés sous forme d'esters de cholestérol par l'action de l'enzyme ACAT-1 du réticulum endoplasmique. Une partie de ce cholestérol peut être efflué par les HDL qui assurent le transport inverse du cholestérol, en agissant avec les macrophages via les récepteurs ABCA-1, ABCG-1 et SR-B1. Les macrophages soumis à des LDL fortement oxydées se transforment en macrophages de type M2b qui secrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, MCP1)²²¹. Si la capacité d'efflux est inférieure à la phagocytose de LDL, les macrophages se chargent en goutellettes d'esters de cholestérol menant à la formation de cristaux de cholestérol, qui entraînent la dysfonction du macrophage et sa transformation en macrophage spumeux.

Durant la progression de la pathologie, l'accumulation intimale de lipoprotéines agrégées et oxydées va augmenter, avec de plus en plus de phagocytes présents dans le cœur lipidique, qui vont se gorger de lipides et de cellules apoptotiques (comme les érythrocytes dans le cas de l'hémorragie intraplaque¹⁶⁵). Ces mécanismes vont changer leur phénotype vers un phénotype pro-inflammatoire qui va favoriser le recrutement d'autres cellules, et quand le système est dépassé, les macrophages enclenchent leur propre apoptose ou nécrose²²². Les cellules apoptotiques sont une source supplémentaire importante de lipides et participent à l'augmentation du cœur lipidique.

L'hypoxie (via HIF-1) ainsi que la sécrétion de facteurs angiogéniques (VEGF, FGF) sécrétés par les acteurs de l'athérosclérose, seraient la cause de la néo-angiogenèse observée dans les plaques avancées et à risque de rupture²²³. Cette néoangiogenèse va accélérer le développement du cœur nécrotico-lipidique, et aggraver la situation en apportant plus de LDL et de monocytes. L'angiogenèse est aussi une cause possible d'hémorragie intraplaque. La fuite d'érythrocytes au sein du cœur nécrotico-lipidique va soit directement entraîner la rupture de la plaque par une augmentation brusque du volume (dans le cas d'une angiogenèse importante, ou d'une chappe fibreuse très fine) soit apporter des érythrocytes au cœur nécroticolipidique, qui vont stagner, entrer en apoptose et apporter massivement du cholestérol membranaire¹⁶⁶ et aussi des catalyseurs d'oxydation des LDL oxydées, provenant du fer contenu dans leur noyau d'hème²²⁴. Ces phénomènes participent donc à la formation d'un cœur nécrotico-lipidique important, avec la présence de lipides fortement oxydés, de cellules nécrotiques provoquant une augmentation du volume de la plaque.

I,3,4,3°) La chappe fibreuse

Les cellules musculaires lisses de la plaque sont extrêmement plastiques, comme expliqué ci-dessus, et de nombreux médiateurs chimiques vont pouvoir provoquer les changements phénotypiques observés dans ce type cellulaire. L'activation de la cellule musculaire lisse est dépendant de l'activation de Klf-4 (un des facteurs de dédifférenciation de Yamanaka)²²⁵. Klf-4 permet une levée de la répression d'un certain nombre de gènes et est globalement un facteur de transcription pro-mitotique. Ces cellules musculaires lisses activées vont se redifférencier à différents degrés, certaines participant au renouvellement des cellules musculaires lisses en division, d'autres participant au cœur nécrotico-lipidique en tant que phagocytes, et enfin certaines jouant un rôle pro-sécrétoire important dans l'établissement de la chappe fibreuse. La vision actuelle propose que c'est l'effet synergique de différents médiateurs qui détermine le phénotype de la cellule musculaire lisse reprogrammée²²⁶. La chappe fibreuse est constituée de plusieurs protéines matricielles comme le collagène et l'élastine, secrétées par les cellules musculaires lisses^{227,228}. Cette chappe a un effet athéro-protecteur, car elle rigidifie la plaque, augmentant sa résistance à la pression ; de ce fait une chappe fine est caractéristique des plaques à risque de rupture. Les mécanismes qui régulent l'épaisseur de la chappe commencent à être connus en réponse à l'augmentation de la pression sanguine, les cellules endothéliales activent la synthèse de MMP-2 et 9 par les cellules musculaire lisse²²⁹. Ces métalloprotéinases jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire nécessaire à la migration des cellules musculaires lisses et donc dans l'augmentation de la chappe fibreuse. Ce mécanisme passe par la synthèse de NO par la eNOS²³⁰. En revanche, le peroxy-nitrite joue lui un rôle activateur des MMP latentes dans la plaque²³¹, de même que différentes espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules spumeuses en condition de stress oxydant²³¹. La formation de chappe fibreuse épaisse (stable) sous-entendrait donc un statut moins inflammatoire de la plaque, ou une dysfonction endothéliale moins prononcée que dans les plaques à chappe fibreuse fine (instable).

Pour récapituler, il semblerait, bien que cela soit encore débattu, que l'athérosclérose soit avant tout une pathologie qui commence par la dysfonction endothéliale, sorte de brèche dans le mur étanche qui limite l'entrée des lipoprotéines dans l'intima. Ces lipoprotéines vont se retrouver oxydées par divers mécanismes et participer à l'aggravation de la dysfonction endothéliale. Si l'influx de lipoprotéines est supérieur à l'efflux, les lipoprotéines vont rester piégées dans l'intima, où elles se retrouveront oxydées et où elles s'agrégeront, au plus proche de la média. En réponse aux signaux provenant de l'endothélium et des lipides agrégés à proximité, les cellules musculaires lisses vont s'engager dans un processus de dédifférenciation/redifférenciation pour gérer les amas extracellulaires de lipides et renforcer l'endothélium par la synthèse de chappe fibreuse pour compenser la faiblesse structurale du cœur lipidique en formation. La stagnation des lipoprotéines et l'incapacité des cellules musculaires lisses à les effluer correctement va entraîner leur oxydation, ce qui les rend alors cytotoxiques. L'effet pro-inflammatoire des cellules

musculaires lisses et des cellules endothéliales va concourir à activer les cellules endothéliales, qui vont attirer et recruter plus de macrophages dans la plaque, et la dysfonction endothéliale va parachever l'augmentation de l'influx de lipides dans la plaque. La plaque va ensuite subir une phase d'accroissement, où les phagocytes de type macrophages vont être de plus en plus présents, et les cellules apoptotiques/nécrotiques aussi. L'hypoxie et l'inflammation présentes dans ce cœur nécrotico-lipique vont favoriser la néoangiogenèse initiée à partir des *vasa vasorum*, source de cholestérol, d'oxydation et de leucocytes. Le stress oxydant présent dans la plaque va alors favoriser le remodelage de la chappe fibreuse, en activant les métalloprotéinases matricielles. Le cœur nécrotico-lipidique très oxydant, très inflammatoire et extrêmement pro-thrombotique, avec une chappe fibreuse rongée par les métalloprotéinases donne les éléments d'une plaque à risque, car structurellement fragilisée et cellulièrement désorganisée.

La première barrière de régulation étant donc les cellules endothéliales, il est important de chercher comment diminuer l'oxydation des lipoprotéines ou leurs effets cytotoxiques sur les cellules endothéliales, qui jouent un rôle régulateur primordial dans le développement de la pathologie.

II°) Stress oxydant

II,1°) Oxydation et genèse des espèces réactives de l'oxygène *in vivo*

Les réactions d'oxydo-réduction sont des réactions chimiques où un électron est donné par l'espèce réductrice à l'espèce oxydante. Ce type de réaction se retrouve dans le monde du vivant, et est largement exploité par les cellules eucaryotes²³². Dans ce chapitre nous parlerons d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme d'un groupe comprenant l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot).

En 1950 Denham Herman propose la théorie selon laquelle les ROS seraient responsables du vieillissement cellulaire (par l'accumulation de dégâts sur les protéines, les lipides et l'ADN). Les découvertes de l'existence physiologique des ROS, de leur impact dans de très nombreuses pathologies du vieillissement et des enzymes antioxydantes ont toutes concouru à provoquer l'engouement des scientifiques pour ce nouveau mécanisme pathogénique²³³. Cependant les échecs répétés des thérapies à base d'antioxydants dans de nombreux animaux modèles²³⁴⁻²³⁶, dans les études cliniques^{237,238}, et la découverte de l'importance des ROS dans plusieurs mécanismes physiologiques²³⁸ et voies de signalisation cellulaire²³⁹ ont un peu nuancé l'image purement négative associée aux ROS à l'époque..

La genèse des ROS commence avec la production de l'anion superoxyde. Différents mécanismes permettent la production cet anion, on citera principalement : l'action enzymatique de la NADPH oxydase²⁴⁰ (présente sur la membrane plasmique des cellules endothéliales et des macrophages), la xanthine oxydase et la mitochondrie, à plusieurs niveaux de la chaîne de transport des électrons²⁴¹. Cette espèce oxydante sera ensuite rapidement convertie en peroxyde d'hydrogène soit par la superoxyde dismutase cytosolique (SOD1) soit par la SOD mitochondriale (SOD2) . Enfin la réaction de fenton (en présence de Fe^{2+}) permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle.

L'anion superoxyde peut réagir avec le NO dans les cellules endothéliales et entraîner une baisse de sa biodisponibilité, ou alors inactiver certaines protéines possédant des domaines ions/soufre²⁴². Normalement, l'anion superoxyde est vite converti en peroxyde d'hydrogène ; une accumulation d'anion superoxyde est alors un signe d'un stress oxydant intracellulaire. Certaines des protéines pouvant être modifiées par l'anion superoxyde jouent d'ailleurs un rôle dans l'adaptation de la cellule à l'augmentation de ROS cytosolique, en promouvant par exemple l'autophagie pour aider à la dégradation des protéines endommagées, ou en engageant l'apoptose si les dégâts sont trop importants ²⁴³.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) joue un rôle de signalisation en oxydant les résidus cystéine de certaines protéines²³⁹ et ce dans des concentrations de l'ordre du nM. Des concentrations plus

élevées produisent des résidus plus oxydés qui forment une interaction plus forte et irréversible, ce qui inactive ces protéines. La cellule ne réagit en augmentant la production de ses enzymes antioxydante que lorsqu'un seuil supérieur est atteint, lorsque la variation de H₂O₂ est importante comme dans le cas de stress oxydant²⁴⁴.

Les radicaux hydroxyle (OH[·]) sont extrêmement réactifs et vont modifier immédiatement les protéines, l'ADN ou même les lipides.

Un résumé schématique de ces mécanismes est proposé **Figure 14**.

II,2°) Oxydation des LDL

Les LDL sont constituées d'un cœur d'esters de cholestérol et de triglycérides avec une enveloppe de phospholipides et de cholestérol libre, le tout structuré par l'ApoB100. Nous avons déjà rappelé préalablement que les LDL natives ne sont pas toxiques *in vitro*, et que seules les LDL modifiées sont toxiques pour les cellules²⁴⁵.

Brown et Goldstein ont montré dans les années 1980 que des lipoprotéines modifiées (pour eux des LDL acétylées) étaient phagocytées bien plus efficacement par les macrophages, et responsables de l'accumulation d'esters de cholestérol dans ces derniers²⁴⁶ par un mécanisme indépendant du LDL-R. Au même moment, Voyta JC et ses collaborateurs montrent que les cellules endothéliales aussi absorbent plus facilement les LDL acétylées, par la voie des « récepteur éboueurs »²⁴⁷. Cependant l'acétylation n'est pas une modification physiologique des LDL. La découverte que l'oxydation des lipoprotéines pouvait notamment générer la lipofuscine présente dans les plaques²⁴⁸ a fait de l'oxydation des acides gras poly-insaturés le suspect de choix d'un équivalent physiologique à l'acétylation des LDL de Brown et Goldstein. Les expériences *in vitro* ont par la suite permis de montrer que les LDL moyennement et fortement oxydés sont capables d'induire des modifications, voire l'apoptose de plusieurs acteurs cellulaires de l'athérosclérose comme les cellules endothéliales¹³¹, les cellules musculaires lisses^{249,250} et les macrophages²⁵¹. Depuis, de nombreuses études ont confirmé le rôle majeur des LDL oxydés dans l'athérogenèse. Les LDL natives peuvent être oxydés à deux niveaux : soit au niveau des protéines (ex ApoB100), soit au niveau des lipides (acides gras insaturés ou cholestérol). La composition en acides gras poly-insaturés varie beaucoup d'un individu à l'autre (25-50% des acides gras totaux des LDL)²⁵², ce qui explique les différences de sensibilité à l'oxydation en fonction de l'origine des LDL.

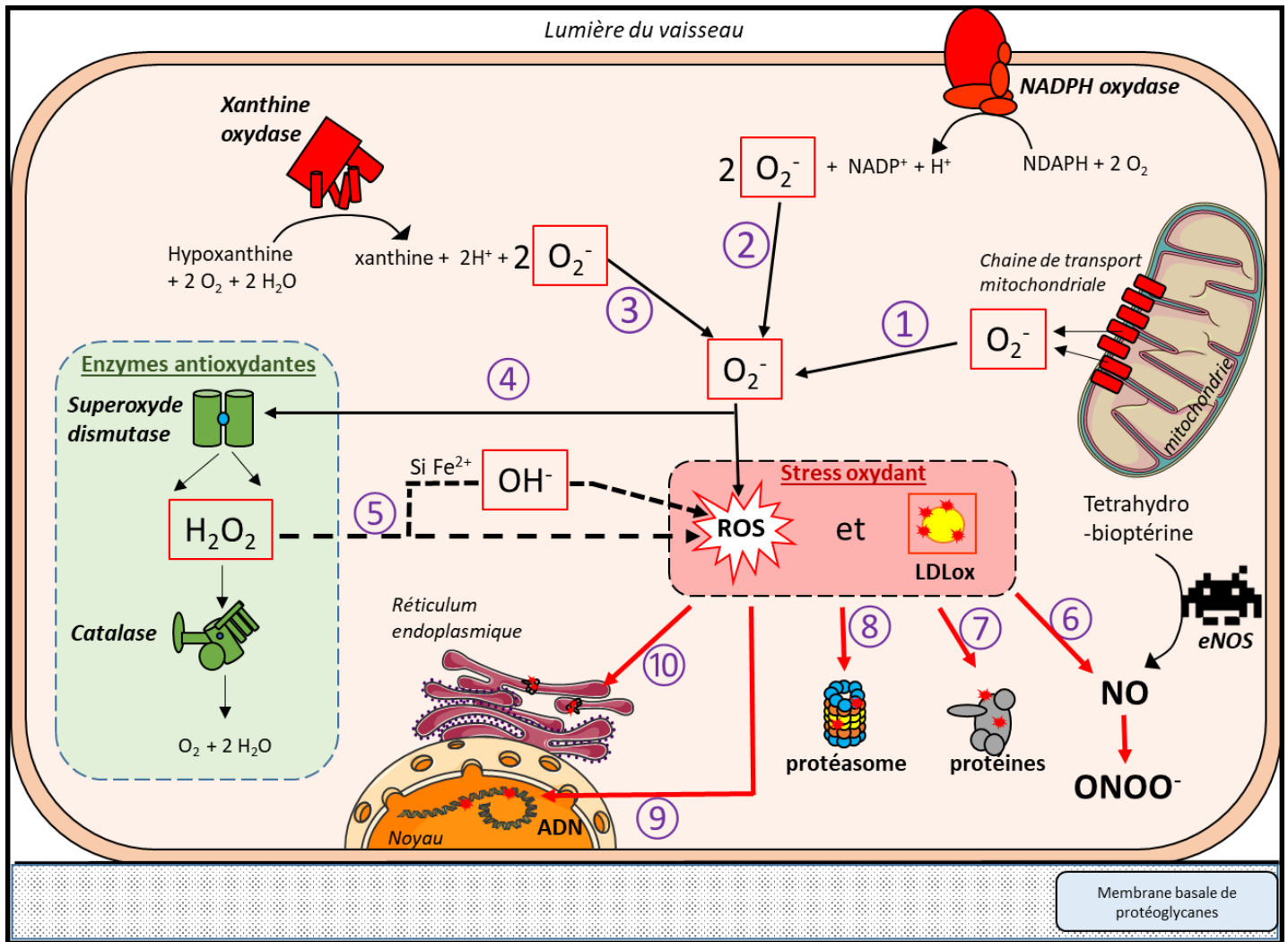


Figure 14 : Origine et conséquences du stress oxydant dans les cellules endothéliales.

Le stress oxydant est généralement dû aux électrons qui fuient de la chaîne de transport mitochondriale, générant des anions superoxydes ①. Cependant dans les cellules endothéliales l'anion supéroxyde est aussi généré lors du fonctionnement de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase ②,③. La plupart des anions superoxydes seront pris en charge par les *superoxyde dismutases* mitochondriales ou cytoplasmiques qui le transformeront en peroxyde d'hydrogène, une espèce moins réactive mais plus stable. Si la quantité d'anions superoxydes produite est faible, le peroxyde d'hydrogène sera rapidement neutralisé par la catalase ④. En revanche, si la quantité de peroxyde d'hydrogène produite est trop importante, il peut soit se transformer en radical hydroxyle (extrêmement réactif) en présence de fer, ou participer lui-même au stress oxydant ⑤. Les ROS ou les LDLox peuvent ensuite réagir avec le monoxyde d'azote (NO) créant du peroxynitrite très toxique pour les cellules ⑥, ou entraîner des dégâts sur les protéines ⑦ (ce qui peut modifier leurs fonctions), sur le protéasome ⑧ (diminue la capacité de la cellule à recycler les protéines endommagées), sur l'ADN ⑨ (peut déclencher l'apoptose ou entraîner la transformation cancéreuse) ou enfin, sur les protéines senseurs au niveau du réticulum endoplasmique ⑩ (ce qui enclenche le stress du réticulum).

Source : image du noyau, de la mitochondrie et du RER provenant de la collection libre de droit de SERVIER Medical Art.

Le modèle d'oxydation des acides gras poly-insaturés (*PolyUnsaturated Fatty Acid* ou PUFA) repose sur l'attaque de ROS (par exemple un radical hydroxyle) sur les PUFA ce qui provoque la destabilisation d'une double liaison C=C et provoque la génération d'un radical peroxy ($OO\cdot$) qui va pouvoir réagir avec le dioxygène et attaquer un autre PUFA, laissant un peroxyde derrière lui et propageant ainsi l'oxydation. Les produits de la peroxydation lipidique sont nombreux, on y retrouve des substrats faiblement réactifs, mais aussi des substrats réactifs comme les composés carbonyles (MDA, glyoxal et méthylglyoxal) des aldéhydes insaturés comme l'acroléine, et des espèces extrêmement réactives comme le 4-hydroxynonanal (4-HNE)²⁵³. De plus, le cholestérol peut aussi être oxydé, produisant différentes espèces d'oxystérols. Le 4-HNE et le MDA ont ensuite la capacité de réagir avec certains acides aminés (cystéine, lysine, histidine) formant des produits d'Amadori. Par ce mécanisme, l'apoB-100 est structurellement modifiée et peut être reconnue par les récepteurs éboueurs²⁵⁴. La LDLox va pouvoir pénétrer les cellules via ces récepteurs et se retrouve alors dans des vésicules d'endocytose, des lysosomes et des inclusions cytoplasmiques²⁵⁵.

Différents mécanismes sont responsables de l'oxydation des PUFA. Certaines enzymes sont produites des ROS capables d'oxyder les PUFA, on citera notamment les NADPH oxydase comme NOX2 et NOX4, la xanthine oxydase, la myéloperoxydase. On peut aussi citer les superoxyde-dismutases dans la génération de radicaux hydroxyles à partir d' H_2O_2 en présence de métaux de transition. En plus de cette modification, on peut aussi noter que la nitration de l'apoB semble être physiologique, indiquant un rôle possible du peroxy-nitrite dans la modification de l'apoB en cas de stress oxydant dans les cellules endothéliales. Les LDLox jouent un rôle majeur dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, mais il n'est pas évident de trouver la (les) cause(s) de l'oxydation des LDL au stade pré-athérome et pré-dysfonction endothéliale. On peut tout de même noter que on retrouve des LDL oxydées à différents degrés dans la circulation, de même que des anticorps dirigés contre des ApoB modifiées²⁵⁶. Leur taux corrèle généralement avec : soit les dyslipidémies²⁵⁷ (taux élevés de LDL-C et faibles taux de HDL-C), soit les pathologies liées à l'inflammation²⁵⁸ (Lupus Erythémateux). Cependant, la plaque d'athérosclérose avancée est beaucoup plus favorable à l'oxydation des lipoprotéines car la synthèse de ROS est augmentée et notamment au niveau du cœur nécrotico-lipidique où la densité de cholestérol est importante et les macrophages activés secrètent beaucoup de ROS. En cas d'hémorragie intraplaque, la présence de métaux de transition facilite l'oxydation des lipoprotéines. Une autre idée complémentaire est que la rétention des lipoprotéines favoriserait leur oxydation dans l'intima. Elle a été proposée par Kevin Jon Williams et Ira Tabas en 1995 sous le nom de « théorie de la réponse à la rétention »²⁵⁹. Pour étayer cette théorie, on observe notamment que la rétention des LDL dans la matrice de protéoglycans favorise leur oxydation en changeant la conformation de l'apoB-100¹⁴⁹ et que les macrophages sont capables de phagocyter avidement les LDL agrégées (indépendamment de leur état oxydatif)²⁶⁰.

Nous avons vu dans ce chapitre les grandes lignes de l'oxydation des LDL, car les mécanismes sont extrêmement complexes et la littérature abondante sur le sujet (voir revue de Stocker R. et Keaney J).²⁶¹

II,3°) LDLox et dysfonction endothéliale

Les LDLox pénètrent les cellules endothéliales via des récepteurs spécifiques en fonction de leur degrés d'oxydation. Les LDL minimalement oxydées (2,6 nmol TBARS/mg ApoB)²⁶² sont recapturées par le récepteur LOX-1²⁶³ et par le récepteur classique des LDL alors que les LDL moyennement oxydées (4-5 nmol TBARS/mg ApoB)²⁶⁴ sont plutôt recapturées par le récepteur SR-A^{265,266}. Le récepteur CD36 est lui un intermédiaire capable de reconnaître les deux plus faiblement^{267,268}. A noter que certains autres mécanismes pouvant être à l'origine de l'absorption des LDL ont été mis en évidence chez les macrophages, avec notamment la macropinocytose²⁶⁹ ou l'endocytose dépendante de TLR (Toll-like Receptors)²⁷⁰.

Comme exposé au chapitre précédent, l'oxydation des LDL charge négativement l'ApoB qui n'est plus reconnue par la voie métabolique du LDL-R mais par la voie des récepteurs éboueurs.

En fonction du niveau d'oxydation, les récepteurs impliqués dans l'absorption des LDL seront différents ainsi que la voie de signalisation déclenchée. Les expériences *in vitro* et sur les modèles animaux ont permis de montrer un effet des LDL minimalement oxydées différent de celui des LDL moyennement ou fortement oxydées. Les LDL minimalement oxydées semblent entraîner un effet prolifératif et angiogénique *in vitro* dépendant du récepteur LOX-1 et de la p38 α ²⁷¹ (une MAPK pléiotrope²⁷²).

les LDL moyennement ou fortement oxydées sont elle capables d'induire l'anoïkis (type d'apoptose déclenché par le détachement de la cellule) des cellules endothéliales grâce à différents mécanismes. Plusieurs voies aboutissant à l'apoptose ont été caractérisées dans l'anoïkis induite par les LDL oxydées.

- **La voie apoptotique du Fas/ Fas-L :**

Fas, le récepteur de mort, induit habituellement la mort des cellules lorsqu'il se dimérise avec son ligand, Fas-L. Ceci crée le « domaine de mort associé à Fas » qui permet l'activation de la caspase 8. La caspase 8 est ensuite capable d'activer la caspase 3 et de cliver Bid en sa forme active, t-Bid (un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, des protéines qui régule la mort cellulaire par la voie mitochondriale, via la formation de pore mitochondrial, qui permet la sortie du cytochrome C, aussi capable d'activer la caspase 3 via la caspase 9). Certaines cellules comme les cellules endothéliales possèdent les deux protéines (Fas et Fas-L) à leur surface mais sont normalement résistantes à l'auto-activation. certaines études montrent²⁷³ que les LDL oxydées provoquent la diminution de c-FLIP, une protéine inhibitrice de l'activation de la caspase 8, permettant ainsi le déclenchement de la signalisation apoptotique alors que d'autres

études montrent une absence d'activation de la caspase 8²⁷⁴. Il est possible que les premiers groupes aient observé une signalisation résultant du détachement des cellules endothéliales comme le suggérerait l'observation de Aoudjit M. et al.²⁷⁵.

- **La voie apoptotique et l'homéostasie du calcium**

L'addition de LDL moyennement oxydées sur des cellules humaines endothéliales microvasculaires (HMEC) en culture provoque l'augmentation d'ions Ca^{2+} intracellulaire¹³², capable d'activer des calpains (vers 12-16h après ajout de LDL) sensible au calcium (capable de cliver Bid) et donc l'activation de la caspase 3¹³². Le réticulum endoplasmique peut aussi induire la mort cellulaire par des interactions avec les mitochondries^{276,277} par exemple via l'AIF (« apoptosis inducing factor ») qui est une flavoprotéine mitochondriale capable, une fois relâchée dans le cytoplasme, de pénétrer le noyau et d'induire la condensation/fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose par des mécanismes indépendants des caspases¹³². Le pic de calcium (0-4h) provient de transporteurs de calcium non identifiés à la membrane plasmique qui permettent l'entrée de calcium extracellulaire. Il est possible qu'une partie de ce .

- **Role du stress du réticulum endoplasmique et de l'UPR (unfolded protein response) dans l'apoptose induite par les LDLox**

Le réticulum endoplasmique est une organelle qui possède de multiples rôles et notamment le transport et les modifications des protéines visant à stabiliser leur structure. Des changements dans l'environnement cellulaire peuvent entraîner des modifications de protéines qui sont ressenties par le réticulum endoplasmique via une protéine appelée Grp78 qui va déclencher l'UPR²⁷⁸. Le changement de conformation de cette protéine signale un problème de structure des protéines ou de recyclage des protéines endommagées..

L'UPR est un mécanisme tolérogène car il permet de donner une chance à la cellule de recycler ses protéines endommagées ou de survivre lors d'un stress aigu (comme une ischémie courte par exemple). Cependant si le stress continue et que l'UPR reste insuffisant pour réguler les protéines endommagées le réticulum favorise alors l'apoptose par des mécanismes dépendants de la mitochondrie (libération du cytochrome C en réponse à l'augmentation de Ca^{2+} cytoplasmique, libération de l'AIF, activation des calpains, etc...).

De nombreuses preuves expérimentales semblent indiquer que les LDL moyennement oxydées sont capables d'induire une UPR soutenue, qui serait alors le mécanisme à l'origine de leurs effets cytotoxiques : les LDLox induisent une réponse UPR totale après 10 à 18h de stimulation incluant une augmentation de la phosphorylation de IRE-1, eIF2 α , une augmentation de CHOP et XBP-1²⁷⁹. Elles induisent aussi une augmentation en réaction du protéasome, probablement due à l'UPR suivie d'une diminution de son activité²⁸⁰. De manière cohérente, on observe aussi une augmentation de l'autophagie, classique de l'UPR pour gérer un grand nombre de protéines/

organelles endomagées²⁸¹. Dernier détail important on observe l'augmentation de calcium intracellulaire, dans une cinétique cohérente avec l'augmentation des marqueurs du stress du réticulum, qui est la voie classique de l'apoptose induite par une réponse UPR non résolue.

Nous avons déjà parlé du MDA, du 4-HNE, des phospholipides oxydés et des oxystérols. Ces produits de l'oxydation des lipides participent tous, à différents degrés, à la toxicité induite par les LDL oxydés et sont capables d'induire l'UPR (voir revue d' A. Nègre-Salvayre et al.²⁸²).

Ces mécanismes pris ensembles proposent une explication cohérente de l'effet toxique des LDL fortement oxydés provoquant la dysfonction endothéliale et l'apoptose des phagocytes du cœur nécrotico-lipidique.

- **LDLox minimalement oxydés, amorçage de la réponse UPR et de l'inflammation.**

Comme précisé plus haut, les lipoprotéines minimalement oxydés sont capturées via le récepteur LOX-1 et vont déclencher une réponse cellulaire différente en fonction de leurs concentrations. La fixation via LOX-1 active la production d'anion superoxyde, via une de ses sous-unité qui est une NADPH oxydase²⁸³ et l'activation de la voie NF- κ B²⁸⁴. De plus, des expériences d'adhésion de monocytes *in vitro* ont montré que le passage des LDL minimalement oxydés via LOX-1 était nécessaire pour leur action sur l'augmentation d'ICAM-1 et de VCAM-1²⁸⁵ (pour rappel deux protéines nécessaires pour l'adhésion des monocytes sur les cellules endothéliales avant la diapédèse) et la sécrétion de MCP-1 (une cytokine chimioattractante). Ce type de LDL modifiées peut aussi pénétrer les cellules via la macropinocytose et interagir avec un récepteur du système immunitaire inné : TLR-4²⁸⁶ induisant dans le cas de LDL minimalement oxydés, une réponse pro-inflammatoire. La synthèse d'anion superoxyde participe aussi à la diminution de la biodisponibilité du NO en formant le peroxynitrite qui empire la situation en provoquant le découplage de la eNOS qui se met alors à produire des anions superoxydes²⁸⁷. Enfin LOX-1 va aussi favoriser la néangiogenèse et donc potentiellement l'invasion intimale par les *vasa vasorum*²⁷¹. Sur les autres types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses et les macrophages l'activation de LOX-1 possède en plus un effet prolifératif^{288,289}.

En résumé, les LDL oxydés sont une population hétérogène, avec des effets cellulaires parfois variables d'un type cellulaire à l'autre.

L'effet des LDL oxydés est médié à la fois par la voie de recapture cellulaire (macropinocytose, LOX-1, autre récepteur éboueur, récepteur aux LDL) et par la nature même des produits d'oxydation des lipoprotéines (MDA, oxystérols, 4-HNE). Les LDL faiblement oxydés sont généralement pro-inflammatoires et pro-mitotiques (cellules musculaires lisses et monocytes) ou apoptotique (cellules endothéliales), alors que les LDL fortement oxydés sont pro-

apoptotiques/nécrotiques et favorisent la formation de cellules spumeuses. Mais il est possible que les deux mécanismes soient reliés par la notion de seuil des produits de peroxydation lipidique.

La séquence suivante peut être proposée : oxydation faible des LDL entraîne la dysfonction endothéliale précoce, la multiplication/différentiation de cellules musculaires lisses et des macrophages, qui provoquent à leur tour une oxydation des LDL générant de plus en plus de LDL oxydées qui sont capturées par les cellules endothéliales et induisent une réponse UPR conduisant à l'apoptose et la nécrose. Cependant, d'autres éléments entrent en jeu : comme nous l'avons vu précédemment, la barrière endothéliale (*in vivo*) est soumise à de nombreux facteurs (stress hémodynamique, facteurs externes, maladies métaboliques etc...) qui favorisent le développement de la pathologie et peuvent pour certains activer des mécanismes indépendamment des LDL oxydées (dysfonction endothéliale, multiplication des cellules musculaires lisses, etc...)

Cependant, l'accumulation des lipides, et leur oxydation sont une constante des plaques d'athérosclérose à des degrés différents. Leur rôle dans la progression de la pathologie les place donc au centre des tentatives de thérapie visant à limiter la progression des plaques d'athérosclérose. Une des manières de neutraliser les effets négatifs des LDL est d'empêcher leur oxydation ; en effet, les patients dont les biomarqueurs sériques d'oxydation sont les plus élevés ont plus de chance de mourir de pathologies cardiovasculaires²⁹⁰.

Un schéma simplifié de l'effet cytotoxique des LDL oxydées sur les cellules endothéliales est proposé **Figure 15**.

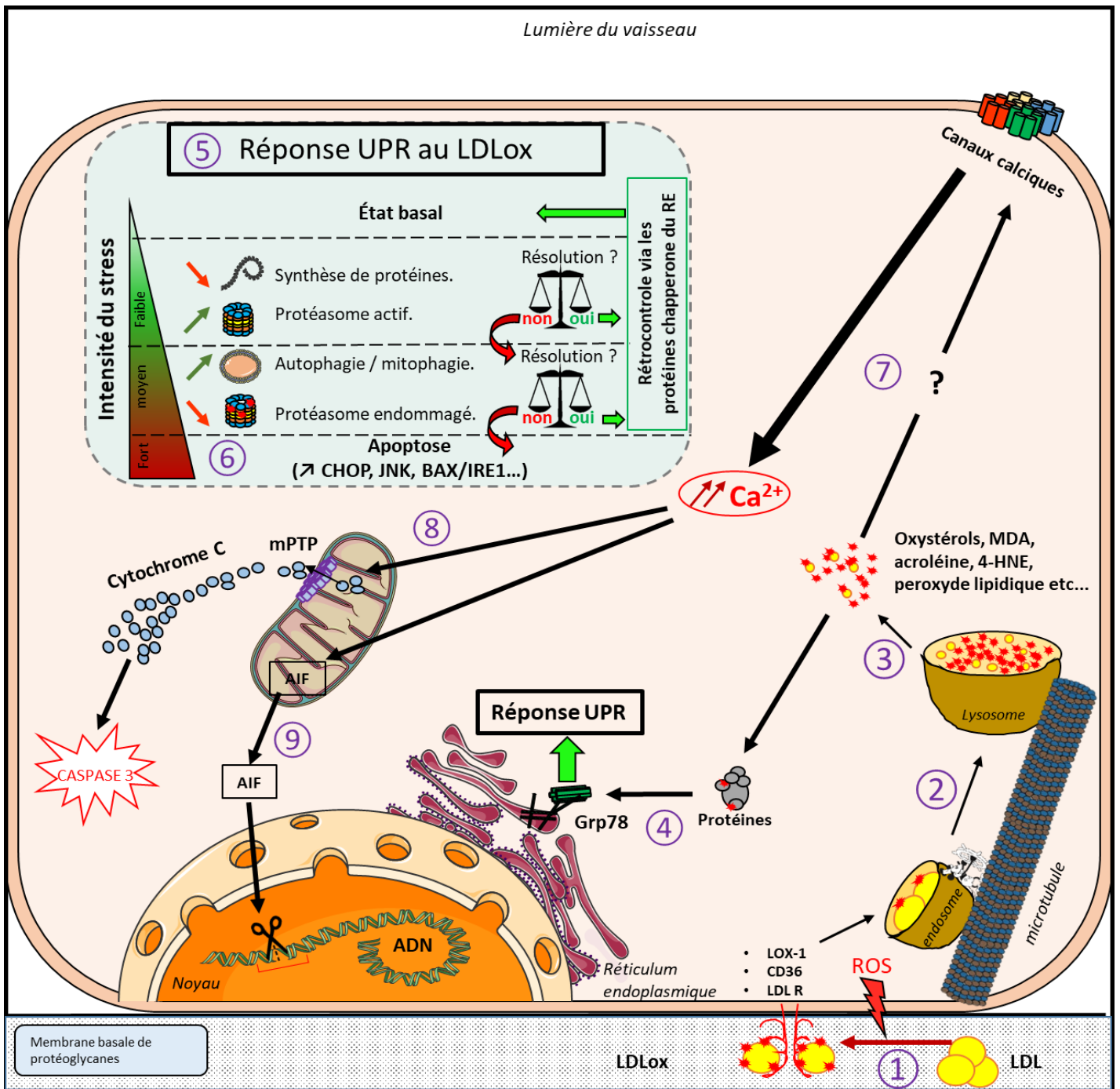


Figure 15 : Effets cytotoxiques des LDL sur les cellules endothéliales

Les LDL sont retenues dans la matrice de protéoglycanes ce qui favorise leur oxydation ① Les LDL peuvent pénétrer les cellules par endocytose via différents récepteurs en fonction de leur niveau d'oxydation. Une fois dans les endosomes elles vont rejoindre les lysosomes qui vont tenter de les dégrader ②. Les produits de d'oxydation des LDL vont se retrouver libérés dans le cytoplasme par des mécanismes encore peu connus ③. Une fois dans le cytoplasme, ils peuvent réagir avec les protéines ④, ce qui peut modifier leur structure, voire leurs fonctions. Les protéines modifiées sont reconnues au niveau du réticulum endoplasmique (ER) qui enclenche alors la réponse UPR ⑤ la réponse UPR va tenter de répondre à ce stress, en jouant un rôle cytoprotecteur. Si elle échoue à résorber le stress, la réponse UPR devient pro-apoptotique ⑥. Ces produits de dégradation des LDL provoquent aussi (par des mécanismes encore inconnus) l'ouverture de canaux calciques membranaires qui génèrent une élévation de calcium intracellulaire ⑦ induisant l'apoptose par un mécanisme dépendant des caspases via l'ouverture du mPTP (activation de BAX/BAK et clivage de Bid par les calpaines) qui libère le cytochrome C et permet l'activation de la caspase 3 ⑧. De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire provoque la libération de l'AIF, une protéine capable de condenser et cliver l'ADN ⑨ et donc induire l'apoptose.

III°) Polyphénols :

III,1°) Présentation des polyphénols

III,1,1°) Description des polyphénols

La définition proposée par l'équipe de Stéphane Quideau de l'université de Bordeaux appelle à considérer le terme polyphénols, pour désigner « des molécules dérivées de la voie des polyketides ou de la voie shikimate/phénylpropanoïde, qui possèdent plus d'une unité phénolique et sans fonction à base de nitrogène » ce qui permet d'écarter les molécules synthétisées par l'homme et les molécules avec un seul groupement phénolique.

Ce sont des métabolites secondaires des cellules végétales qui assurent diverses fonctions au sein de celles-ci. Par exemple certains polyphénols jouent un rôle hormonal ou participent à des mécanismes de défense contre les prédateurs ou agents infectieux, ont un rôle anti-UV et antioxydant ²⁹¹. La découverte des polyphénols n'est pas récente mais elle a gagné en popularité au moment de la théorie du vieillissement oxydatif et au vu des résultats *in vitro*, contre un certain nombre de pathologies comme les cancers, l'athérosclérose ou la maladie d'Alzheimer. La structure chimique des polyphénols leur donne certaines capacités en particulier antioxydante en piégeant les radicaux libres et en chélatant les métaux (grâce au groupement hydroxyle). Ils peuvent aussi agir comme antibiotique et se fixer aux protéines²⁹² (ce qui peut expliquer leur capacité à modifier des voies de signalisation intracellulaire).

On doit notamment rappeler, à ce stade, que les polyphénols représentent la source la plus importante d'antioxydants de l'alimentation.

III,1,2°) Présentation des différentes classes de polyphénols

Plus de 8000 espèces de polyphénols ont déjà été identifiées. La famille des polyphénols se sépare en trois grands groupes : les acides phénoliques (parmi lesquels on retrouve l'acide gallique et l'acide caféique), les non-flavonoïdes (dont les stilbènes comme le resvératrol, les lignanes et les tannins comme l'acide tannique), et les flavonoïdes (le plus grand groupe, représentant plus de la moitié des polyphénols identifiés). Une représentation graphique des différentes classes de polyphénols, ainsi que ceux issus des plantes utilisées durant cette thèse est proposée **Figure 16**.

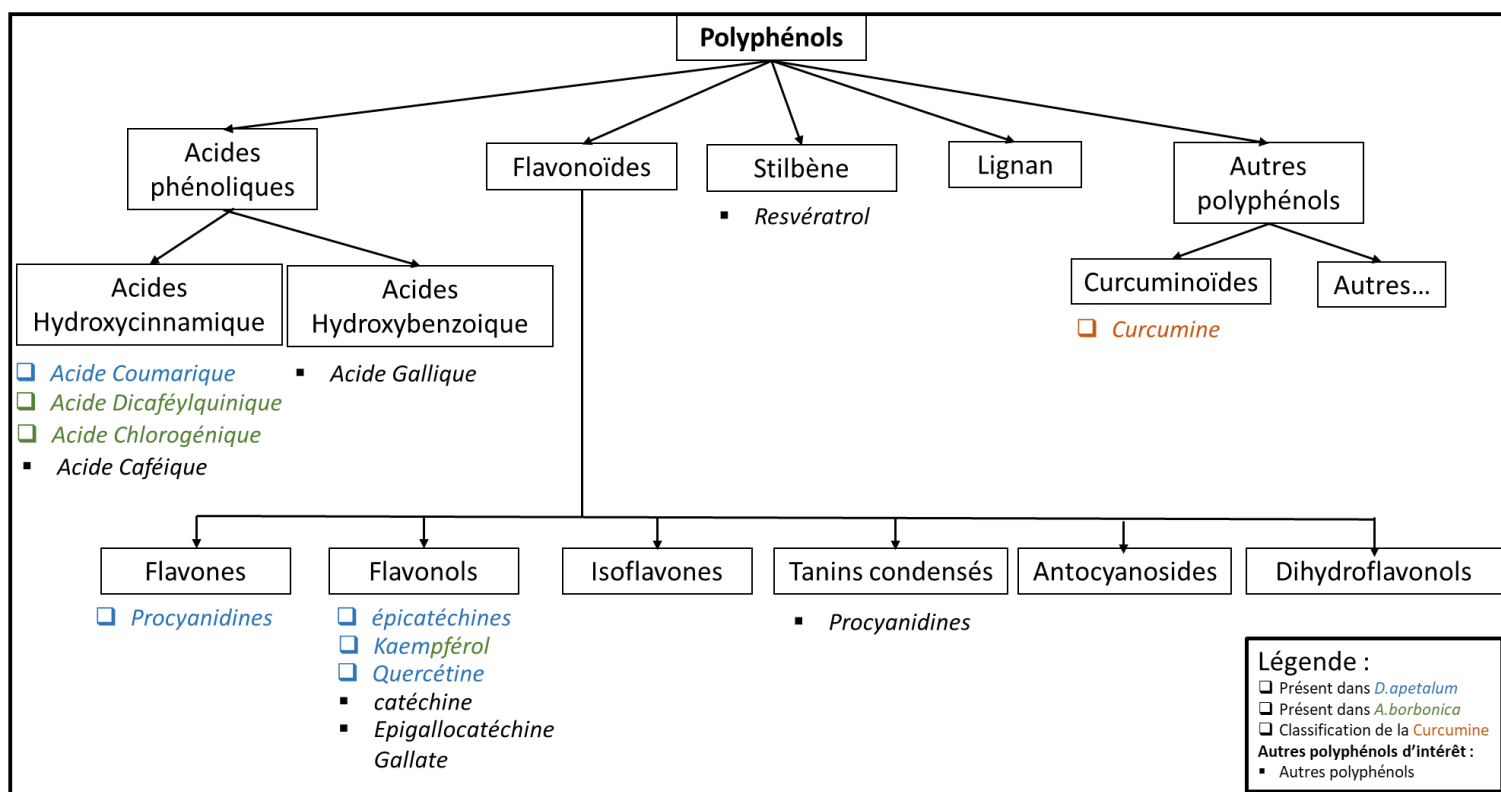


Figure 16 : Classification des Polyphénols retrouvés par UPLC dans des extraits acétone aqueux (70%) de *D. apetalum* et *A. borbonica* (feuilles/tiges)

III,1,3°) Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés dans les cellules végétales, de manière tissu- dépendante, à partir de la dégradation des carbohydrates produits par le cycle de Calvin. Ces carbohydrates peuvent être mobilisés pour produire des polyphénols par la voie de la glycolyse ou celle des pentoses phosphates. Ces voies sont interconnectées car la voie oxydative des pentoses phosphates produit le glycéraldéhyde 3-phosphate qui est le précurseur initial de la glycolyse. Le pyruvate obtenu à la fin de la glycolyse va entrer dans le cycle de l'acétate/malonate et former le malonyl-CoA, le précurseur des stilbènes, flavonoïdes et aussi les curcuminoïdes et autres. Le phosphoenolpyruvate (précurseur intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose-4-phosphate (de la voie oxydative des pentoses phosphates) peuvent entrer dans la voie des shikimates, produisant l'acide shikimique, précurseurs des acides aminés aromatiques, des tanins, des lignanes et, en rentrant dans la voie des précurseurs phénylpropanoïde (comme le malonyl-CoA), des acides phénoliques.

III,1,4°) Polyphénols alimentaires et maladies cardiovasculaires

Plusieurs facteurs ont joué dans l'explosion des études concernant les polyphénols dans les dernières années (**Figure 17**).

Pour commencer, des études statistiques sur la mortalité cardiovasculaire dans différents pays (1981/1989)^{293,294} à donné lieu à l'observations que certains pays du bassin méditerranéen (notamment la France et l'Italie), étaient moins touchés par les maladies cardiovasculaires, que d'autres pays européens ayant le même niveau de développement socioéconomique. Ces observation décrites sous le nom de « paradoxe français » et « régime méditerranéen » mettent l'accent sur l'importance de l'alimentation et notamment des polyphénols²⁹⁵. De plus, la théorie du vieillissement oxydatif, couplé à la découverte de l'importance des phénomènes oxydatifs dans de nombreuses pathologies majeures, ont conduit naturellement les chercheurs à suspecter l'importance des polyphénols dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Ceci provoqua un gain d'intérêt majeur pour les recherches sur les polyphénols, et leurs rôles dans différentes pathologies.

Parmi les publications concernant les polyphénols, il faut distinguer celles qui utilisent des polyphénols purs (de synthèse ou purifiés) et celles qui utilisent des extraits végétaux, riches en polyphénols (différentes techniques d'extraction existent, le plus souvent avec des solvants polaires comme des alcools). L'efficacité de ces polyphénols purs, ou de ces matrices riches en polyphénols est alors testée sur des modèles acellulaires, cellulaires ou animaux.

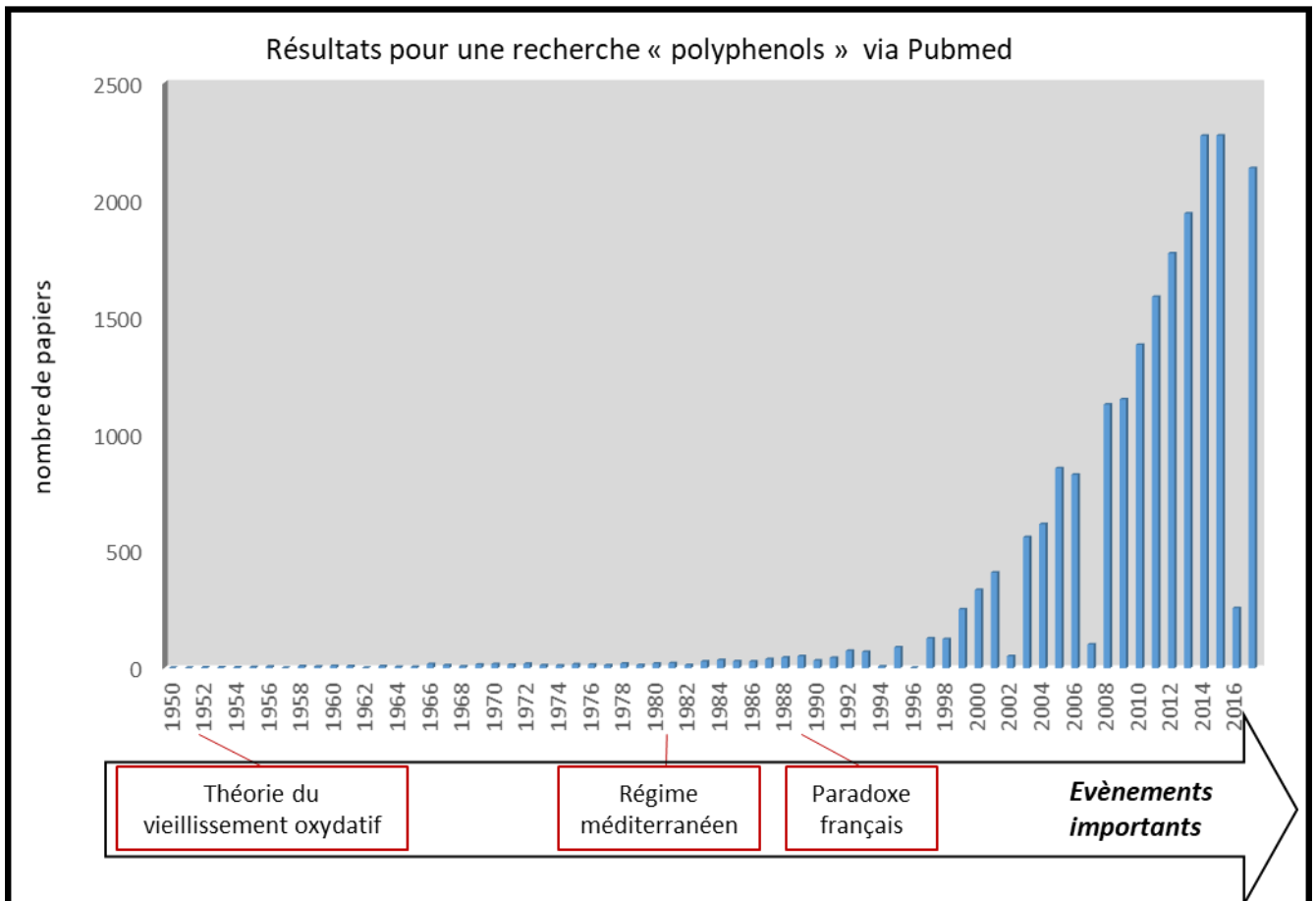


Figure 17 : Diagramme montrant l'augmentation du nombre d'articles figurant dans Pubmed avec la recherche du mot-clé « polyphénols » au cours du temps.

Nous allons nous concentrer ici sur la littérature qui parle de l'effet des polyphénols (purs ou matrice végétale) sur les maladies cardiovasculaires. Bien que la littérature sur des modèles acellulaires, cellulaires ou animaux soit la plus abondante, il existe plus de 500 études cliniques visant à étudier l'impact des polyphénols sur la santé cardiovasculaire. Dans la méta-analyse publiée en 2008²⁹⁶ de plusieurs de ces études cliniques, des défauts de conception notamment en ce qui concerne l'effet placebo, semblent expliquer une partie des dissonances entre les différentes études cliniques. De plus, les doses, la fréquence, la chronicité et la forme d'administration jouent sûrement aussi un rôle important dans ces résultats contradictoires. Enfin, l'échec de certains polyphénols ou matrices végétales est parfois du uniquement à la faible biodisponibilité de ces polyphénols, qui sont peu absorbés ou métabolisés trop rapidement. Certains groupes, bien que ne remettant pas en cause les données épidémiologiques qui montrent bien une association entre polyphénols et diminution des risques cardiovasculaires, précisent néanmoins que l'hypothèse polyphénol/antioxydant/ diminution des MCV n'est pas aussi évidente et qu'il manque encore de réelles preuves expérimentales²⁹⁷.

Parmi les polyphénols ou matrices végétales utilisés, certains polyphénols reviennent plusieurs fois dans la littérature pour des raisons d'efficacité biologique et parfois de logique industrielle et mercantile. Parmi ces polyphénols, on retrouve notamment la curcumine, issue du ryzome des plantes du genre *Curcumma*, l'épicatéchine, l'épigallocatechine et l' épigallocatechine gallate présente dans le thé vert, le cacao et le vin. La quercetine, présente dans de nombreux végétaux mais principalement dans le cacao, l'origan mexicain, le sureau et le câprier, enfin, les polyphénols du vin rouge, notamment les anthocyanines et le resvératrol. On peut aussi citer le keampférol, les procyanidines et les acides phénoliques.

A titre illustratif, voir ci-dessous quelques exemples de composés nutritionnels et de leur impact sur la santé cardiovasculaire.

- Chocolat noir

Une méta-étude récente²⁹⁸ incluant des études cliniques de plus de 100 000 individus, montre que l'ingestion de cacao a un effet positif sur la santé cardiovasculaire, notamment en réduisant les taux circulants de glucose et d'insuline, ainsi qu'une diminution des triglycérides, du cholestérol total et du LDL cholestérol. Cependant, il est difficile d'avoir suffisamment d'études cliniques s'intéressant à d'autres biomarqueurs circulants plus spécifiques comme ICAM-1/VCAM-1 le TNF-alpha ou le NO. Les mécanismes proposés sont principalement une augmentation de la biodisponibilité du NO, une baisse (legère) des cytokines pro-inflammatoires. Le polyphénol suspecté dans la littérature est l'épicatéchine, présent en grande quantité dans le cacao.

- Le vin rouge

L'intérêt de la communauté scientifique pour le vin rouge vient directement du « paradoxe français » qui le considérait comme la cause de ce phénomène. Cependant, une grande partie de l'effet observé dans les études avec le vin rouge venait principalement de l'alcool, qui consommé modérément possède des propriétés athéroprotectrices (courbe de risque cardiovasculaire en U²⁹⁹). Des études plus récentes avec du vin rouge dé-alcoolisé montrent de nombreux effets *in vitro* et sur des modèles animaux ³⁰⁰, mais les résultats sont encore peu nombreux en études cliniques. Le rôle athéroprotecteur du vin rouge est une combinaison complexe d'effet de l'alcool avec les nombreux polyphénols retrouvés dans le vin rouge. Parmi ces polyphénols, on retrouve notamment des procyanidines (dimères et trimères), de la quercétine et du resvératrol ³⁰¹⁻³⁰⁴. La quercétine et le resvératrol sont deux polyphénols du vin rouge qui, bien que peu biodisponibles, ont des effets atypiques et intéressants sur la signalisation cellulaire.

- Thé vert/noir :

Le thé est une des boissons les plus consommées dans le monde. Le thé semble capable de diminuer la tension et d'améliorer le profil lipidique ainsi que les marqueurs pro-inflammatoires (thé vert) *in vivo*^{305,306}. Les polyphénols majeurs du thé sont les flavanols épicatechine, épigallocatechine, EGC et EGCG.

Pour conclure sur les études cliniques, les recherches sur les polyphénols se sont d'abord concentrées sur leur capacité antioxydante. Suite aux nombreux échecs des essais cliniques portant sur la supplémentation en antioxydant³⁰⁷⁻³⁰⁹ (ex : vitamin E), les études cliniques portant sur des polyphénols alimentaires se sont aussi intéressées aux capacités anti-inflammatoires, à la compliance vasculaire et aux paramètres lipidiques. Pour l'instant, les études ciblant les paramètres lipidiques sont trop peu nombreuses et il y a des problèmes de mise au point de normalisation des essais cliniques qui commencent peu à peu à être réglés³¹⁰. Les progrès sur la compréhension des mécanismes par lesquels des polyphénols arrivent à activer différentes voies intracellulaire, sur des modèles cellulaires ou animaux, sont probablement l'avenir des polyphénols. Mais reste alors un problème majeur : la biodisponibilité des polyphénols.

III,2°) Biodisponibilité des polyphénols

Plusieurs facteurs agissent sur la biodisponibilité des polyphénols d'origine nutritionnelle^{311,312}. Chronologiquement la première barrière est la variabilité de synthèse des polyphénols dans une espèce végétale donnée, par exemple en fonction de l'ensoleillement, ou des propriétés nutritionnelles de l'environnement. La seconde barrière concerne les processus de transformation de la matière première (processus industriel ou naturel). La troisième barrière est constituée par les processus complexes d'absorption des polyphénols lors de la digestion. Ce stade est critique

car chaque polyphénol est plus ou moins absorbé, et cette absorption est aussi influencée par la matrice du bol alimentaire qui les contient. La quatrième barrière est représentée par la stabilité des polyphénols. Certains polyphénols sont métabolisés durant leur trajet de l'intestin vers la circulation, il convient alors de savoir si les métabolites restent actifs et si cela ne modifie pas leur profil d'élimination rénale. La cinquième barrière est leur temps de rétention dans la circulation active. Enfin la sixième et dernière barrière est la capacité des polyphénols à atteindre la cellule cible.

III,2,1°) Première barrière : « l'effet écosystème »

Les polyphénols représentent une classification très large, incluant de nombreux métabolites secondaires des plantes. Les plantes ont développé des capacités d'adaptation importantes pour se protéger des changements environnementaux. Cette adaptation est spécifique et dépend de la synthèse de polyphénols. Comme les polyphénols remplissent des fonctions très variées, seuls certains voient leur synthèse augmenter en réponse à un stress donné ³¹³. L'environnement peut provoquer des variations de production importantes (de plus d'un facteur 10 ³¹⁴) ou faible, en fonction du polyphénol. Le sol, les techniques de culture, les conditions météorologiques, les variations interspèces et l'écosystème parasitaire sont autant de facteurs capables de moduler les taux de polyphénol ³¹⁴.

Si on imagine le futur des polyphénols médicinaux, cet effet terroir représente une vraie barrière pour la qualité des aliments/ produits médicinaux.

III,2,2°) Deuxième barrière : transformation industrielle et naturelle

La transformation de la matière première, de la récolte à la consommation, peut être naturelle (phénomène d'oxydation causant le brunissement des fruit par exemple) ou due au processus industriel (séchage, broyage, chauffage etc..). De manière générale, tout ce qui permet de libérer les polyphénols de leur compartiment cellulaire favorise leur absorption, mais cela entraîne dans le même temps la libération des enzymes capables de les oxyder, A noter que les polyphénols sont inégaux quant à leur sensibilité aux différents processus de transformation.

III,2,3°) Troisième barrière : absorption des polyphénols

Le premier facteur influençant l'absorption est la taille des particules alimentaires. Le gros de la libération des polyphénols se passe généralement dans l'estomac grâce aux enzymes et au pH assez bas qui permet de libérer les polyphénols sous forme non-conjuguée, ce qui favorise leur

libération de la matrice et augmente leur absorption. Dans l'intestin, l'augmentation du pH permet l'activation des enzymes du pancréas qui vont achever le processus de digestion enzymatique. Les sels biliaires et la lipase vont permettre la formation de micelles qui vont pouvoir intégrer les polyphénols polaires comme apolaires.

Concernant les mécanismes d'absorption, il y a une hétérogénéité parmi les polyphénols, certains sont absorbés au niveau de l'intestin (ex : quercétine³¹⁵ aglycone, acide caféique, acide chlorogénique etc...) et d'autres ont besoin d'être déconjugué par les enzymes bactériennes au niveau de l'intestin (quercetin glycoside et de manière générale la plupart des polyphénols) ³¹⁶. Les mécanismes exacts de captation des polyphénols par les entérocytes ne sont pas connus. Les études sur la lignée Caco-2 ³¹⁷ semblent indiquer que les polyphénols de faible poids moléculaire comme les acides phénoliques, les épicatechines et les catéchines peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Des études controversées semblent indiquer que les polyphénols glycosylés peuvent être absorbés par le transporteur SGLT1³¹⁸.

Après absorption par les entérocytes, les polyphénols sont en grande partie reconjugés (subissent des modifications de leurs par glucuronidation, sulfatation ou méthylation) avant d'être excrétés dans la circulation par les transporteurs : ATP-binding cassette , MCT1/4/5 et MRP1/3/5 et 6 ³¹¹. Une seconde phase de reconjugaison peut ensuite avoir lieu dans le foie.

Enfin, la matrice du bolus contenant les polyphénols peut aussi jouer sur leur absorption des et vice-versa (notamment la présence de lipides qui semble augmenter l'absorption^{319,320} et l'impact des fibres végétales qui ralentissent l'absorption des polyphénols³²¹).

III,2,4°) Quatrième barrière : stabilité des polyphénols

Lors de leur passage dans le tractus digestif, certains polyphénols sont absorbés directement, d'autres ont besoin d'être déconjugés et enfin certains doivent être métabolisés par la flore intestinale avant que leurs produits de dégradation ne puissent pénétrer la barrière intestinale. C'est le cas, par exemple, de la curcumine métabolisée en plusieurs produits moléculaires comme la dihydrocurcumine qui conserve une partie seulement de ses des activités. Tous les produits de dégradation des polyphénols ne sont pas connus à l'heure actuelle et ils sont rarement étudiés dans les études de biodisponibilité, à cause du manque global de standard pour les technique de dosage classiquement utilisée (HPLC, spectrométrie de masse). Globalement, peu de choses sont connues sur les métabolites des polyphénols si ce n'est qu'ils sont très importants car, pour certains polyphénols, ce sont eux qui passent la barrière et qu'ils conservent certaines fonctions du polyphénol d'origine.

III,2,5°) Cinquième barrière : temps de rétention des polyphénols

Le taux de rétention des polyphénols dans la circulation sanguine varie beaucoup d'un polyphénol à l'autre. Les polyphénols peuvent être transportés dans le sang sous forme libre ou associés à des protéines³²² ou des lipoprotéines³²³. Il n'y a pas encore d'étude portant sur l'impact de ces associations sur la demi-vie plasmatique des polyphénols qui peut varier de 2h (anthocyanines) à 8h (isoflavones) suite à quoi ils peuvent être éliminés soit par voie urinaire (pour les polyphénols polaire) soit par voie biliaire (pour les apolaires). Cette demi-vie plasmatique peut aussi être influencée par d'autres facteurs comme l'âge ou l'obésité³²⁴.

III,2,6°) Sixième barrière : répartition tissulaire des polyphénols

Relativement peu d'études ont observé la distribution tissulaire des polyphénols à l'heure actuelle. Les quelques études publiées (par broyage des tissus suivi d'une analyse HPLC) semblent indiquer que certains polyphénols ont une répartition tissulaire non homogène³²⁵, mais tant que les métabolites secondaires de chaque polyphénol ne seront pas bien caractérisés il sera compliqué de déterminer leur biodistribution.

Tous ces processus montrent la complexité de l'utilisation des polyphénols *in vivo*, et comme de nombreuses zones d'ombre mécanistiques persistent encore, il est difficile d'espérer qu'un effet observé *in vitro* soit retrouvé *in vivo*. Pour pallier tous les problèmes liés à l'absorption, de nouvelles techniques d'encapsulation permettent d'augmenter nettement les taux plasmatiques de certains polyphénols faiblement absorbés. Mais on sort alors du champ de « l'alimentation thérapeutique » et on rentre plutôt dans le champ du médicament. Les stratégies de recherche actuelles se concentrent plutôt sur la technique « essayer et voir » qui consiste à administrer des extraits riches en polyphénols et à observer des changements au niveau de biomarqueurs pertinents pour une pathologie donnée. Les technologies d'encapsulation sont en plein développement depuis quelques années et ne manqueront pas de potentialiser les polyphénols repérés dans les études observationnelles.

III,3°) Curcumine et espèces utilisées dans l'étude

III,3,1°) Curcumine

La curcumine est le polyphénol majeur issu du rizhome de *Curcuma longa*. Il est classé parmi les curcuminoïdes. C'est un polyphénol pleïotrope très étudié, notamment dans le cadre du cancer, de l'ischémie-reperfusion, des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires³²⁶. De nombreuses cibles de la curcumine ont été identifiées *in vitro*. Elle est capable de moduler des gènes et protéines influençant l'inflammation (effet anti-inflammatoire : HO-1, NF- κ B, TNF- α , MCP-1, IL- β /6/8...³²⁶⁻³²⁸), la prolifération/l'angiogenèse (effet cytostatique : Bcl-2, la voie JAK-STAT3...³²⁹⁻³³¹) et dans le contexte plus restreint de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale : augmentation de synthèse d'HO-1³³², de la biodisponibilité du NO³³³, de la résistance au stress pro-apoptotique induit par des LDL oxydées³³⁴, de l'autophagie protectrice³³⁵. C'est un polyphénol apolaire (plus stable en solution lipidique), stable à pH acide mais beaucoup moins stable à des pH alcalins. De plus, sa stabilité dans les conditions de culture cellulaire est assez mauvaise³³⁶. Les métabolites (bactériens) de la curcumine incluent la dihydrocurcumine et la tétrahydrocurcumine (qui possèdent des propriétés légèrement différentes de la curcumine et sont parfois plus actifs^{337,338}). L'absorption de la curcumine est très faible chez l'homme³³⁹, mais peut être améliorée de différentes manières (la prise de l'alcaloïde piperine, retrouvé dans le poivre augmente l'absorption d'un facteur 20 et les techniques d'encapsulation en cours développement encore plus³⁴⁰). Une fois absorbée, la curcumine ou ses métabolites sont conjugués par glucuronidation ou sulfatation.

III,3,2°) *Antirhea borbonica*

Antirhea borbonica. (**figure 18**) est une plante médicinale endémique de l'île de la Réunion et de l'île Maurice, inscrite à la pharmacopée européenne traditionnelle. C'est une plante de la famille des Rubiaceae qui porte le nom vernaculaire de bois d'osto. C'est un petit arbre pouvant atteindre les 10 m de hauteur, avec une écorce grise et lisse et des feuilles simples généralement verticillées. Les graines sont contenues dans des baies d'aspect rougeâtre à maturité. Culturellement, on lui attribue surtout des vertus astringentes, mais elle a aussi été utilisée pour traiter les ulcères de l'estomac, contre la fièvre et pour accélérer la cicatrisation. La littérature scientifique faisant état des polyphénols d'*antirhea borbonica* se limite à l'heure de l'écriture de ce manuscrit à deux publications de l'équipe DÉTROI^{341,342} et étudie principalement l'impact d'extrait riches en polyphénols sur un lignée murine de pré-adipocytes (3T3-L1) dans la première étude de Méry Marimoutou et al.³⁴¹ L'ajout d'extraits riches en polyphénols (ERP) d'*Antirhea borbonica* n'affecte pas la viabilité des 3T3-L1 (jusqu'à 200 μ M) et protège efficacement ces cellules d'un stress apoptotique induit par l'H₂O₂, probablement via les propriétés antioxydante de l'extrait. De manière plus spécifique aux adipocytes, la coincubation

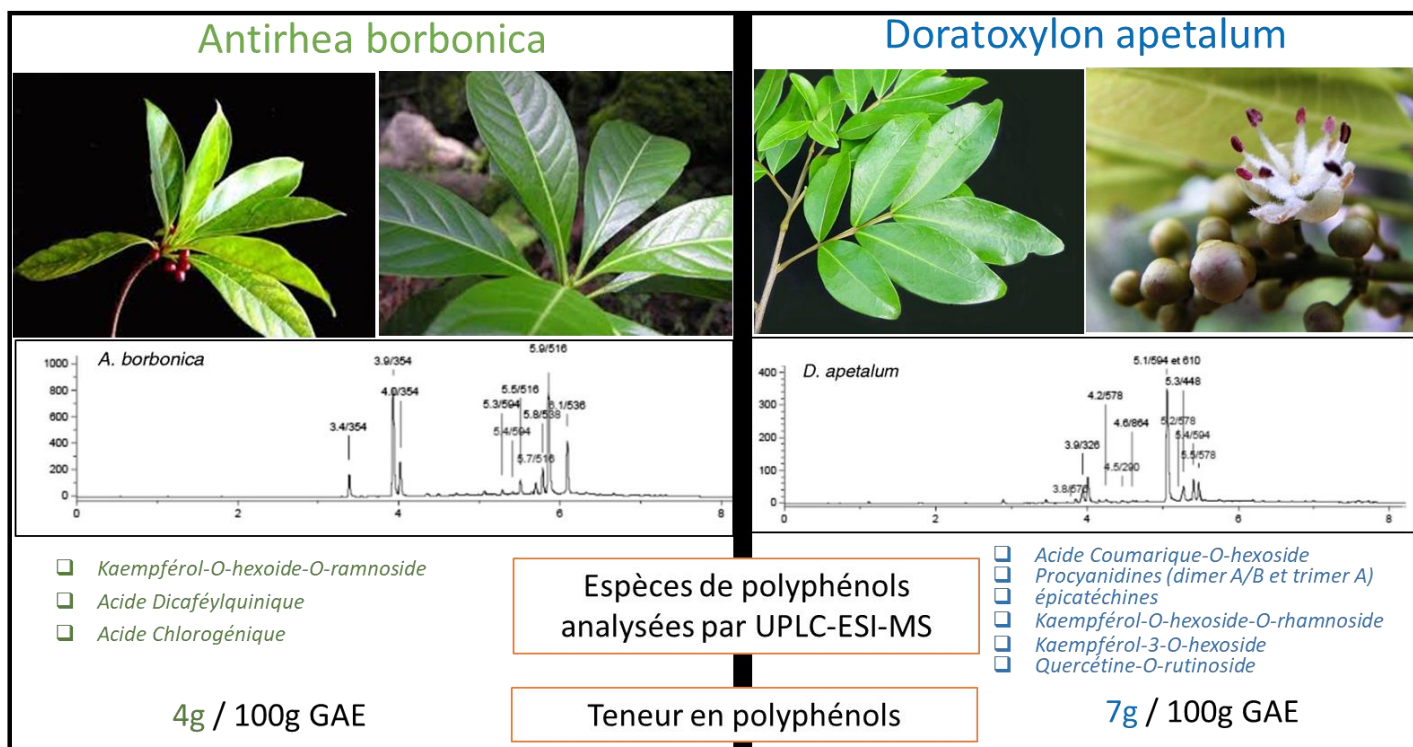


Figure 18 : Composition en polyphénols des deux espèces végétales utilisées dans cette étude.

d'extrait d' *Antirhea borbonica* à 25µM équivalent acide gallique (EAG) avec du TNF-α (5ng/mL) permet de limiter significativement la sécrétion de ROS induite par le TNF-α, mais pas significativement la production d'IL-6 ou de MCP-1. Cependant, quand l'inducteur du stress cellulaire est du lipopolysaccharide bactérien (LPS), *Antirhea borbonica* permet de diminuer significativement l'augmentation de ROS intracellulaire et la sécrétion d'IL-6 (mais pas celle de MCP-1). L'étude de l'expression de système antioxydant cellulaire (SOD) et de voie de signalisation pro-inflammatoire (NF-κB) a aussi été réalisée en présence des trois stimuli précédents (TNF-α, LPS et H₂O₂) en co-incubation avec l'ERP d'*Antirhea borbonica*, montrant sa capacité à restaurer de manière significative la transcription de la superoxyde dismutase et à diminuer l'augmentation de transcription de NF-κB induite par ces stress. Dans le second papier, Fanny Le Sage et al.³⁴² étudient l'impact de l'ERP d'*Antirhea borbonica* sur les 3T3-L1 stressés avec des LPS de *P. gingivalis* et d'*E. coli*. Cette étude met en avant des capacités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait capable de contrer les effets du LPS, notamment par une augmentation des enzymes antioxydantes (MnSOD, catalase) et de médiateurs anti-inflammatoires comme PPARγ et l'adiponectine.

L'origine d'*Antirhea borbonica* utilisée dans ce document est strictement la même que celle utilisé par *Marimoutou et al.* Et comme les procédés d'extraction sont rigoureusement similaires, nous pouvons utiliser l'analyse UPLC-ESI-MS qu'elle a réalisé pour estimer la composition polyphénolique de nos extraits à savoir de l'acide chlorogénique, du Kaempférol-O-hexoside-O-rhamnoside et de l'acide dicaféoylquinique.

- Acide dicaféoylquinique

L'acide dicaféoylquinique est un acide hydroxycinnamique très peu étudié. Il semble que l'acide 1,5- dicaféoylquinique est capable d'augmenter la translocation de Nrf2³⁴³ (une voie de résistance au stress oxydant) et d'activer la voie PI3K/AKT/mTOR (voie de l'autophagie)³⁴⁴, tandis que l'acide 3,5- dicaféoylquinique joue apparemment un rôle cytoprotecteur dans une lignée de cellules endothéliales stressées par des LPS bactériens³⁴⁵.

- Acide chlorogénique :

L'acide chlorogénique est aussi un acide hydroxycinnamique ; des études récentes sur une primoculture de cellules endothéliales humaines (HUVEC) ont montré qu'il était capable de contrer la vague calcique et l'augmentation de ROS induites par des phospholipides oxydées (pour mimer les LDL oxydées)³⁴⁶. Il est aussi capable d'améliorer la biodisponibilité du NO et d'inhiber la signalisation NF-κB³⁴⁷.

- Kaempferol-O-hexoside-O-Ramnoside :

Le kaempferol est un flavanol capable d'activer plusieurs voies cellulaires : il joue un rôle cytostatique dans les cellules cancéreuses³⁴⁸, il possède un effet anti-inflammatoire assez puissant (via l'inhibition de NF- κ B)³⁴⁹ et une étude³⁵⁰ récente montre que le kaempferol à des concentrations assez hautes (50 - 200 μ M) est capable de protéger en partie des HUVEC d'un stress cytotoxique induit par des LDL oxydées, via l'augmentation de l'autophagie par la voie PI3K/AKT/mTOR.

III,3,3°) *Doratoxylon apetalum*.

Doratoxylon apetalum (Poir.) Radlk. (**figure 18**) est un arbre d'endémisme de l'île de la Réunion, Maurice et Madagascar. Il fait partie de la famille des *sapindaceae* et porte le nom vernaculaire de bois de gaulette car il a surtout servi pour ses propriétés mécaniques (très solide) qui le rendaient très utile en menuiserie. Il a été utilisé en médecine traditionnelle sous forme de décoction mais n'est pas inscrit à la pharmacopée traditionnelle et les pratiques médicinales utilisant le bois de gaulette sont partiellement perdues. C'est un arbre dioïque à rameaux brun foncé. Les feuilles juvéniles sont de petite taille et découpées, alors que les feuilles adultes ont des folioles entières. Les fleurs sont regroupées en masses compactes. Elles ont des étamines jaunâtres et un calice doré. Le fruit est noir et ovoïde.

Un seul article scientifique étudiant l'impact thérapeutique de *Doratoxylon apetalum* existe dans la littérature (Marimoutou et al.³⁴¹). Sur la lignée 3T3-L1 l'ERP de *Doratoxylon apetalum* (25 μ M EAG) est capable de protéger efficacement les cellules d'un stress cytotoxique avec 200 μ M d' H_2O_2 (annulation de l'effet cytotoxique, prévention de l'augmentation des ROS observés à 24h, et diminution de la sécrétion d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire. L'ERP de *Doratoxylon apetalum* est aussi capable dans ce modèle cellulaire de fortement diminuer l'impact du TNF- α ou du LPS pendant 24h (il réduit la production de ROS, la sécrétion d'IL-6 et de MCP-1). Parmi les mécanismes impliqués Marimoutou *et al.* ont mis en avant une augmentation de la SOD (enzyme antioxydante) en présence de H_2O_2 et du LPS mais pas du TNF- α . On observe aussi un effet régulateur sur l'augmentation de NF- κ B activé par les trois stress cités plus haut. Dans le cadre de cette étude ce sont surtout les capacités anti-inflammatoires et la modulation des mécanismes de production de ROS qui ont été étudiés.

L'origine de *Doratoxylon apetalum* utilisé dans cette thèse est strictement la même que celle utilisée par Marimoutou *et al.*. Nos extraits contiennent des procyanidines dont des dimères de type A, de type B et des trimères de type A. De plus on retrouve de l'acide coumaric-O-hexoside, de l'épicatéchine, du Kaempferol-O-hexoside-O-ramnoside, du Kaempferol 3-O-hexoside et enfin de la quercétin-O-rutinoside. La matrice semble donc très diversifiée en polyphénols.

- Procyanidines :

Les procyanidines sont des tannins condensés, formés par l'assemblage de deux (ou plus) unités de catéchine et/ou épicatechine. Ce sont des polyphénols de masse molaire importante, ce qui explique en partie leur faible biodisponibilité, seuls quelques dimères étant biodisponibles³⁵¹. Ils sont réputés surtout pour leur capacité antioxydante importante, ce qui s'explique facilement car 1 mole de procyanidine contient l'équivalent de 2 mole de catéchine. Parmi les effets des procyanidines *in vitro*, on retrouve la capacité à protéger les cellules endothéliales de la mort induite par différents stress (LDL glyquées par exemple)³⁵², à diminuer l'inflammation (via l'inhibition de l'inflammasome et de NLRP3 activé par du LPS bactérien)³⁵³ et à améliorer la synthèse de NO³⁵⁴.

- Acide coumarique

L'acide coumarique est aussi un acide hydroxycinnamique. Il inhibe les voies AKT et ERK importantes pour l'angiogénèse³⁵⁵. De plus, dans les cellules endothéliales il est capable de diminuer le stress inflammatoire induit par l'homocystéine (un acide aminé produit de la dégradation des méthionines ou cystathionines et qui est retrouvé épidémiologiquement corrélé avec l'athérosclérose chez l'humain³⁵⁶), mais pas par le TNF- α ³⁵⁷.

- Epicatechine

L'épicatechine est un flavanol, il participe à la biodisponibilité du NO dans des modèles cellulaires de cellules endothéliales. L'effet principal est une augmentation du NO via l'activation de eNOS³⁵⁸ (de manière indépendante de sa voie canonique qui fait intervenir le calcium et la calmoduline). Cet effet est probablement médié par la capacité de l'épicatechine à se lier au récepteur membranaire de l'œstrogène et l'activation subséquente de la voie PI3K/AKT³⁵⁹.

- Kaempférol

On retrouve le même kaempférol-O-hexoside-O-ramnoside que dans l'ERP d'*Antirea borbonica*, avec cette fois-ci en plus du kaempférol-O-hexoside. Il n'existe pas de donnée à ma connaissance sur ces variations chimiques du kaempferol.

- Quercétine

La quercétine est une molécule très intéressante. Probablement un des polyphénols les plus prometteurs avec le resvératrol et les flavonols en général. Parmi les champs d'investigation qui s'intéressent à la quercétine on retrouve : les stratégies thérapeutiques contre le cancer (sensibilisation des cellules cancéreuses aux radio- et chimio-thérapies, tout en protégeant les cellules non cancéreuses^{360,361}), la neurobiologie (pour ses capacités neuroprotectrices³⁶²) et surtout le champ de recherche concernant l'athérosclérose. La quercétine a besoin d'être conjuguée (exemple : glucuronidation) avant de pouvoir avoir ses effets sur les cellules endothéliales³⁶³. Les études sur la quercétine portent principalement sur des modèles cellulaires

du fait de sa faible concentration et absorption au niveau de l'alimentation³⁶⁴. Parmi les fonctions de la quercetine, on retrouve des fonctions anti-oxydantes, anti-inflammatoires³⁶⁵, « anti-sénescence cellulaire »^{366,367} ainsi que la capacité à activer la SIRT1³⁰³ (une histone déacétylase capable de modifier un certain nombre de gènes critiques dans l'adaptation cellulaire à différents stress). Enfin, la quercetine est capable d'augmenter l'autophagie protectrice *via* des modulations de mTOR^{368,369}. Bien qu'une certaine littérature scientifique commence à exister sur la quercetine, elle est encore largement incomplète. Du fait de sa très faible biodisponibilité, il est peu probable que la quercetine joue un rôle thérapeutique uniquement *via* l'alimentation, mais des stratégies visant à améliorer la biodisponibilité et l'efficacité de la quercetine risquent d'ouvrir un champ thérapeutique passionnant.

L'ERP de *Doratoxylon apetalum* présentent une richesse intéressante en polyphénols, qui mérite probablement des investigations plus poussées.

Conclusion de l'introduction :

Du fait de l'importance de la dysfonction endothéliale et du rôle des espèces pro-oxydantes dans la pathologie de l'athérosclérose, les polyphénols, qui possèdent de bonnes capacités antioxydantes, représentent une option thérapeutique intéressante. En plus de leurs capacités antioxydantes, il est probable que certains polyphénols activent des mécanismes intracellulaires encore mal compris, aboutissant à l'activation de différentes voies de signalisation. La richesse du répertoire des molécules d'origine végétale est immense, et n'a eu de cesse de proposer des nouveaux médicaments au fur et à mesure que la compréhension du corps et des pathologies humaines progresse, les espèces endémiques représentent donc un réservoir intéressant de candidats thérapeutiques que les chercheurs n'ont jamais cessé d'explorer. C'est dans ce contexte que se sont situés mes travaux de thèse, portant sur plusieurs espèces endémiques de l'île de la Réunion comme *A.borbonica* ou *D.apetalum*. Le but de cette thèse était d'étudier l'impact de matrices riches en polyphénols extraits de ces deux plantes, en les comparant à la curcumine pure dans un modèle simplifié de dysfonction endothéliale. Des études *in vitro* visant à étudier leurs capacités à empêcher l'oxydation des LDL, ou à contrer les effets cytotoxiques et inflammatoires des LDL oxydées ont tout d'abord été réalisés, puis nous avons testé les capacités anti-inflammatoires d'une de ces plantes (*D. apetalum*) dans un modèle de souris ApoE KO âgées avec un régime riche en graisses capable d'augmenter le statut inflammatoire des plaques d'athérosclérose. Au cours de ce doctorat, nous avons réalisé les tests *in vitro* à Toulouse, dans l'UMR 1048 sous la direction du Dr Cécile Vindis, puis nous avons réalisé la fin des expériences *in vitro* et les expériences *in vivo* dans l'UMR 1188 sous la direction du Dr Olivier Meilhac.

Matériels et Méthodes

I°) Partie *In vitro* :

Modèle cellulaire :

La lignée HMEC-1 (human microvascular endothelial cells) obtenue du CDC (Atlanta, GA, USA) est une lignée cellulaire humaine, immortalisée par un plasmide PBR-322, contenant la région codante du virus simien (SV40) 40 A. Ces cellules sont cultivées dans un milieu MCDB 131 (gibco ; Life Technologies) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal (gibco, Life Technologies), 100 U/ml de Pénicilline (0,5%), 100µg/ml de streptomycine (0,5%) (Sigma), et 2mM L-Glutamine (gibco, Life Technologies)(0,5%). Lors de certaines expériences les cellules ont été déprivées avec du milieu R0% (qui consiste en du RPMI 1640 + GlutaMAX (gibco, Life Technologies) contenant 1% de Pénicilline/streptomycine.)

Les cellules étaient passées à confluence (à peu près 4 jours) en utilisant 2ml de Trypsine-EDTA 1X (gibco, Life Technologies). Une fois décollés, les 2ml de suspension cellulaires ont été repris avec 8ml de milieu de culture MCDB 131 à 37°C, et 1ml de cette suspension cellulaire était repiqué en T75 ou utilisé pour nos expériences (sauf indications contraires).

La lignée EA.HY926 est un hybridome de cellules de cordon ombilical humain avec le clone A546 (lignée de cellules d'épithélium pulmonaire humaine résistant à la thioguanine). L'hybridome a certaines caractéristiques de cellules épithéliales comme l'expression du facteur VIII et la présence de signes caractéristiques des cellules endothéliales comme les corps de Weibel-Palade. Elles peuvent aussi réagir au facteur pro-angiogénique, à l'inflammation et au NO.

Les EA.HY926 sont cultivées en milieu DMEM avec 10% sérum avec 100 U/ml de Pénicilline (0,5%), 100µg/ml de streptomycine (0,5%) (Sigma), et 2mM L-Glutamine (gibco, Life Technologies)(0,5%). Au moment de l'ensemencement on rajoute aussi du HAT qui permet la sélection des hybridomes. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence puis réensemencées à 500 000c/t25.

Les THP-1 sont une lignée cellulaire dérivée d'une leucémie monocytique aigue humaine. Elle conserve des propriétés de monocytes tel que la présence du complément, du récepteur au fragment constant et la capacité de phagocytose. Elles sont capables d'être différenciées en macrophages en présence de PMA. Elles sont cultivées dans un milieu RPMI enrichi avec 10% de sérum, 100 U/ml de Pénicilline (0,5%), 100µg/ml de streptomycine (0,5%) (Sigma), et 2mM L-Glutamine (gibco, Life Technologies)(0,5%). Enfin on rajoute aussi 50µM de 2-mercaptoéthanol. Les cellules ont été passées tous les 3 jours en moyenne, et ensemencées à une densité de 500 000c/t25.

Préparation des LDL oxydées :

Les LDL sont obtenues à partir de pool de sérum humain sain, préparé par ultracentrifugation (rotor Vti50 ; Beckman optima le-80K) différentielle (gradient KBr) et dialysé contre du PBS contenant 342 μ M d'EDTA. La concentration des LDL obtenue via le dosage de l'apoB est déterminée par immunonéphélométrie. Finalement les LDL sont filtrées (0,22 μ M), et stockées à 4°C. Avant utilisation les LDL sont directement diluées à 2g ApoB/mL dans du PBS contenant 5 μ M de CuSO₄. L'oxydation se fait dans 3mL (Vf) dans des béchers (surface d'exposition = 3,5cm²). Les LDL sont soumises à des UV-C (lampe OSRAM, 254nm, 0,5 Mw/cm², à 10cm de la lampe) pendant deux heures, puis stérilisées (filtre 0,22 μ M). Les travaux précédents du laboratoire³⁷⁰ ont décrit cette oxydation comme faible à moyenne, produisant 71 à 104 nmol d'hydroperoxydes lipidiques et 6,4 à 9,7 nmol de TBARS par mg d'apoB.

Préparation des ERP de *D.apetalum*, *A.borbonica* et de la curcumine :

Le matériel végétal issu de *D.apetalum* et *A.borbonica* à été récolté à l'île de la Réunion et identifié par des botanistes agréés. Le tableau ci-dessous indique quelle plante à été utilisée lors de quelle expérience (via son numéro d'identification) :

<i>Doratoxylon apetalum</i>		
N° d'identification	Quantité	Utilisation
RUN-055E	2g	manip I°) figure 1, 2, 3, 4, 5
N°1807	15,4 g	manip souris vague 1
N°1707	27,5 g	manip souris vague 1
N°2307	41,3 g	manip souris vague 1
N°2308	70,16	manip souris vague 1 et 2
N°2309	55,7	manip souris vague 2
En cours d'émission	140	manip souris vague 3
<i>Antirhea borbonica</i>		
N° d'identification	Quantité	Utilisation
RUN-052F	2g	manip I°) figure 1, 2, 3, 4, 5
<i>Curcumine</i>		
Sigma (C7727)	0,368g	manip I°) figure 1, 2, 3, 4, 5

Pour les ERP des manips de culture cellulaire : 1g de plante a été mis en suspension dans 10 mL de solution d'acétone aqueux à 70% dans un Falcon 15. Après 1h30 à 4°C et à agitation constante

l'ensemble est centrifugé à 3500rpm. Le surnageant est récupéré et aliquoté par 100µL et conservé à -80°C pour limiter les cycles de congélation/décongélation.

La curcumine est préparée à 10mM dans de l'éthanol 70% en suivant le protocole proposé par Sigma, puis aliquotée et stockée à 80°C.

Dosage de la capacité réductrice des ERP : Dosage au Folin :

Un protocole classique de dosage au Folin contre une gamme d'acide gallique est réalisé. Succintement, dans une plaque 96 puits on prépare en triplicata : 25µL d'une gamme d'acide gallique (par dilution en cascade, de 0 à 1mM) ou des différentes dilutions de nos ERP (pur ou dilué au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} ou 1/1000^{ème}). A cela on rajoute 125µL de réactif de folin (au 1/10^{ème} dans l'eau) et 100µL de Na₂CO₃ (75g/L dans l'eau). Le tout est homogénéisé et placé 1h à 30°C. Enfin la lecture de l'absorbance à 760nm permet de comparer les capacités réductrices de nos échantillons en équivalence acide gallique.

Dosage des Hydroperoxydes au Xylénol orange :

La méthode utilisée ici est une méthode dérivée de celle employée par Wolff SP^{371,372}. Succintement, 100µg d'ApoB (LDL natives) ont été incubés dans 500µL de PBS en présence de 4µM de CuSO₄ avec ou sans les ERP de *D.apetalum*, *A.borbonica* ou la curcumine à 25, 50 ou 100µM. A la fin de l'incubation 50µL de solution sont prélevés et ajoutés à 450µL de solution FOXO (fraichement préparée à partir de 1 part de solution A contenant 250mM d'acide sulfurique, 2,5mM de sulfate ferreux et 1mM de xylénol orange, avec 9 part de la solution B contenant 4,4mM d'hydroxytoluène Butylé (BHT) dans du méthanol 100%). Après 30mn d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont vortexés et centrifugés 10mn à 12000g. Le supernatant est récolté et la densité optique mesurée à 560nm. Les résultats sont ensuite exprimés par rapport à la condition contrôle, soit les LDL natives avec le cuivre seul.

Dosage des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) généré lors de l'oxydation des LDL par les cellules en culture :

Pour cette technique nous avons utilisé le protocole modifié de Yagi K³⁷³, couramment utilisé dans l'équipe. Les cellules (HMEC-1) ont été cultivées dans des plaques 6 puits jusqu'à 80/90% de confluence puis déprivées sur la nuit. 1h avant l'expérience le milieu de déprivation a été changé par du milieu frais contenant 1,5µM de CuSO₄ et les polyphénols aux concentrations indiquées pour pré-stimuler les cellules. A T0 nous avons rajouté 50µg ApoB/mL de LDL natives dans les

puits et laissé incubé pendant 6h à 37°C. 500µL de surnageant a ensuite été récupéré et congelé à -20°C avant analyse.

Le test TBARS consiste à mélanger 100µL de milieu de culture ainsi obtenue avec 100µL d'une solution (0,375% d'acide thiobarbiturique, 15% d'acide trichloroacétique dans de l'HCL aqueux à 0,25N) le tout est incubé 10mn à 95°C puis vortexé et centrifugé 10mn à 400g. le surnageant est récupéré et on mesure la fluorescence (exc 515nm/ emis 548nm). On compare les échantillons à une gamme étalon de Malondialdehyde (MDA).

Dosage des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire par la sonde H₂DCFDA.

Les cellules HMEC ont été cultivées jusqu'à 80/90% de confluence en plaques 12 puits et déprivées sur la nuit. 1h avant l'expérience les cellules ont été prétraitées avec nos ERP ou la curcumine puis on rajoute les LDL oxydées (200µg/mL) au UV/cuivre, pendant 1h ou 5h. Le milieu est ensuite rincé et on rajoute du milieu HBSS 1X avec 5µM de la sonde H₂DCFDA. Après rinçage des puits, les cellules récupérées dans du HBSS1X/ 0,2% triton X100 sur glace. La lecture se fait à exc : 485 / emis : 530 nm . les protéines sont dosées par Bradford pour normaliser les mesures de fluorescence. Enfin, les valeurs normalisées sont rapportées aux valeurs de fluorescence observées chez le contrôle. Pour les expériences utilisant l'H₂O₂ nous avons pré-traité avec les polyphénols comme précédemment mais à la différence des LDL oxydées qui induisent une augmentation chronique des ROS intracellulaires , le H₂O₂ représente un stress aigu. Nous avons donc d'abord traité les cellules avec 500µL de HBSS/sonde pendant 45 mn puis nous avons changé le milieu et rajouté 500µL de HBSS/H₂O₂ (200µM) pendant 30mn avec les ERP ou la curcumine. La fluorescence et les protéines sont obtenues comme précédemment.

Mesure de l'endocytose des LDL carbocyanées.

Pour réaliser cette technique nous avons d'abord réalisé le marquage des LDL au DiIC₁₈. 1.5mg de Carbocyanine sont dissous dans 500µL de DMSO, puis mélangés avec 20mL de sérum humain délipidé contenant 10mg de LDL. Les LDL sont incubées sous agitation lente, 12h à 37°C. Les LDL marquées sont ensuite ré-isolées par ultracentrifugation et dialyse avant d'être utilisées ou stockées à 4°C à l'obscurité. Lors de l'expérience, des HMEC à 80/90% de confluence sont déprivées sur la nuit puis, 1h avant le début de l'expérience, préstimulées avec nos ERP ou la curcumine. A t₀ on rajoute 200µg/mL de LDL carbocyanées. Après 8h d'incubation, les cellules sont rincées au PBS, des photos sont prises pour illustrer, puis les cellules sont récupérées dans 500µL de PBS. La fluorescence est alors mesurée à : exc 520 / emis 568nm.

Test de la Fonction Mitochondriale au MTT :

Le Sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényl tétrazolium) peut être réduit au niveau des mitochondries par la succinate déshydrogénase en formazan, un précipité insoluble dans l'eau, mais soluble dans un solvant polaire (DMSO).

Succinctement, les cellules (HMEC) ont étéensemencées en plaques 12 puits, puis déprivées le lendemain pendant une durée minimale de 7h avant d'être préstimulées 1h avec du milieu R0%/curcumine (1,5 ou 10 μM), R0%/D. *apetalum* (10, 25 ou 50 μM GAE), R0%/A. *borbonica* (10, 25 ou 50 μM GAE) ou du R0% seul ; Puis on rajoute au milieu de culture 200 μg ApoB/ml de LDL oxydées. Après environ 20 heures d'incubation, quand la mortalité semble atteindre les 50% dans le contrôle (estimé par la quantité de cellules arrondies), l'expérience est arrêtée, le milieu de culture est enlevé et les cellules lavées rapidement au R0%, puis on ajoute 500 μl de MTT-R0% (poudre MTT de Sigma, utilisé à une concentration finale de 0,5 mg/ml) par puits, et on laisse incuber pendant 30mn à 37°C. Le milieu est ensuite enlevé et on lyse les cellules dans 500 μl de DMSO (Euromedex), en grattant les cellules avec un cône de p1000 pour s'assurer de dissoudre tout le formazan. 200 μl de cette solution sont ensuite répartis en plaque 96 puits, et l'absorbance de la solution à 540 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN infinite M200).

Lors de l'expérience présentée en **Figure 25**, les HMEC étaitensemencé en p96 puits, chaque condition étant représentée en n=8 réplicata. Les cellules étaient cultivées jusqu'à obtenir 80/90% de confluence puit stimulées avec des LDL oxydées (UV/cuivre, 200 μg ApoB/mL) pendant 24h jusqu'à obtenir environ 50% de viabilité par rapport à la condition « contrôle ». Au temps indiqué on rajouter l'ERP de D. *apetalum* à une concentration finale de 25 μM GAE. A la fin de l'expérimentation on réalise un test MTT directement dans la plaque après solubilisation des cristaux.

Comptage de la mortalité cellulaire par le marquage IP/SYTO13.

Le marquage IP/SYTO13 est constitué de SYTO13 (Life Technologies) qui est un intercalant à l'ADN perméant, qui va marquer toutes les cellules en vert, ainsi que d'un contremarquage à l'iodure de propidium (IP) : un intercalant à l'ADN non-perméant qui marque les cellules mortes en rouge.

Ce double marquage permet donc de distinguer les cellules vivantes (vert), des cellules en début d'apoptose/nécrose (orange) ou en fin d'apoptose/nécrose (rouge). Succinctement, les cellules ont été stimulées comme lors du test MTT, mais à la place du MTT on rajoute cette fois-ci 500 μl de R0%/IP(1 μl /ml)/SYTO13(0,5 μl /ml). Après 20mn d'incubation à 37°C, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence inversée (Leitz FLUOVERT). Puis on capture 4 champs représentatifs du puits. Les cellules sont comptées et séparées en 3 catégories : en vie,

début d'apoptose/nécrose ou apoptose nécrose, en fonction de leurs marquages et/ou de leurs phénotypes (noyaux pycnotique, cytoplasme très réduit ect...).

Western Blot.

Les HMEC ont été cultivées en boîte de pétri de 10cm de diamètre jusqu'à 80/90% de confluence puis déprivées sur la nuit avant la stimulation. Les cellules sont préstimulées 1h avec 25µM GAE de nos deux ERP ou 10µM de curcumine avant l'ajout de 200µg ApoB/mL de LDL oxydées pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et récupérées dans du tampon ripa. Après une étape de fractionnement mécanique et une centrifugation à 14000rpm 10mn les protéines sont dosées et stockées à -20°C. On utilise ensuite des techniques d'électrophorèse classique en déposant entre 20 et 50µg de protéines par condition en fonctions de la quantité de protéines obtenue et on réalise un transfert liquide sur membrane de PVDF. La révélation à lieu par chimiluminescence avec des anticorps secondaires couplés à la HRP. Pour les expériences de flux, on rajoute la bafilomycine commerciale à la concentration finale de 10nM dans le milieu de culture, 1h avant la fin de l'expérimentation. Sauf dans la condition « bafilomycine seul » dans laquelle on rajoute la bafilomycine à t0.

Test de l'adhésion des Monocytes.

Ce test vise à étudier l'activation inflammatoire de la cellule endothéliale. En réponse à certains stimulus, la cellule endothéliale sécrète plus de VCAM-1 et ICAM-1 à la surface apicale, qui joue un rôle dans l'adhésion des monocytes. Pour ce test des EA.HY926 sontensemencées (35 000c/puits) dans des plaques 96 puits. Lorsque les cellules atteignent la confluence on les déprime sur la nuit. Après pré-stimulation avec l'ERP de *D.apetalum* (25/50µM GAE) on rajoute des concentrations non-cytotoxiques de LDL oxydées (UV/Cuivre, 20/50µg ApoB/mL) pendant 8h ou du Tnf-alpha comme contrôle positif (10ng/mL). puis les cellules sont rincées deux fois au PBS. Peu avant la fin de la stimulation on prépare les monocytes marqués : pour cela on prépare 10⁷ THP1 dans 1mL de HBSS transparent dans lequel on rajoute aussi 20µM (concentration finale) de BCECF-AM. Après 15mn d'incubation les monocytes sont rincés et centrifugés deux fois (400g/10mn) Les cellules sont ensuite reprises dans 10mL de HBSS transparent.

A la fin de la stimulation on rince les EA.HY926 deux fois au PBS et on lit la fluorescence une première fois (exc : 488 ; emis :500-545) correspondant à la fluorescence basale. Puis on ajoute 100µL de solution de THP-1 et on incube 1h à l'incubateur. on lit la fluorescence une deuxième fois correspondant à la fluorescence totale avant de lancer quatre rinçages dans de l'HBSS

transparent. (chaque lavage correspond à changer le milieu et à poser la plaque sur un agitateur orbital pendant 1mn. Enfin on lit la fluorescence restante une dernière fois. La quantité de monocyte accroché est dépendante de la formule :

$$\% \text{ d'adhésion} = \frac{\text{fluorescence restante} - \text{fluorescence basale}}{\text{Fluorescence totale} - \text{fluorescence basale}}$$

II°) Partie *In Vivo* :

Expérimentation animale :

18 souris mâles de souche black6 ApoE -/- réparties en trois vagues ont été utilisées durant cette étude. Les souris ont été élevées au sein de l'animalerie du CYROI en accord avec les règles de bioéthique d'expérimentation animale européennes, et du comité d'éthique du CYROI. Les souris ont reçu un régime spécial de high fat avec une base western diet et 17% casein, 0,3% DL-méthionine, 34% sucrose, 21% beurre de lait, 5% cellulose, 14,5% amidon de maïs, 7% de céréales MC 205B SAFE, 1% de vitamine 200 SAFE et 0,2% cholestérol.

A 10 mois les souris ont été enrôlées pour l'étude et réparties aléatoirement en 2 groupes : le groupe **contrôle** gavées 1fois/jours avec 100µL de PBS, et le groupe ***D.apetalum*** gavées 1fois/jours avec 100 µL d'extraits enrichis en polyphénols de *D.apetalum* resolubilisé dans 100µL de PBS (concentration finale 17µM GAE par dose). Voir la partie *préparation des extraits lyophilisés de polyphénols* pour plus d'informations sur la préparation des doses pour les souris du groupe *D.apetalum*.

La durée totale de l'expérience était de quatre semaines. Durant la durée de l'expérience, l'eau était fournie *ad libitum*, mais la quantité de nourriture ajoutée dans les cages à été notée chaque semaine pour estimer la quantité de nourriture ingérée par les souris. Le poids des souris à été noté chaque jours avant le gavage. Des prélèvements rétro-orbitaux ont été effectués une fois par semaine sur des souris anesthésiées avec 2,5% d'isoflurane Le sérum à été récupéré après coagulation/centrifugation dans des eppendorf et congelé à -20°C en attendant le dosage avec tous les échantillons pour étudier les paramètres lipidiques et des cytokines pro-inflammatoires. Après quatre semaines de traitement les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane avant d'être euthanasiées. L'ensemble du sang périphérique à été récupéré par ponction dans l'oreillette droite. Le sérum obtenu à partir de ce sang à ensuite été aliquoté et stocké à -20°C. Le système des souris à été purgé au PBS du sang résiduel et les organes suivants ont été récupérés et congelés

après flash freezing à -80°C : Foie ; Tissu adipeux épидидimal ; Rein ; Cerveau ; Cœur et Aorte De plus nous avons récupéré l'arc aortique, congelé dans du tissu tec (OCT) pour marquage au CD68.

Préparation des extraits riches en polyphénols de *D.apetalum* et dessiccation :

Les feuille et tiges identifiées comme étant du genre *Doratoxylon apetalum* ont été séchées à sec 24h, réduites en poudre fine à l'aide d'un mixer, identifiées et stockées dans des contenants hermétiques. 70g de poudre était ensuite pesés et mis en suspension dans 350mL d'acétone aqueux à 70% pendant 3h à 4°C, sous agitation lente dans un contenant hermétique et à l'abri de la lumière.

Après plusieurs étapes de centrifugation pour se débarrasser des débris, un aliquot est gardé pour dosage au réactif de folin, Le reste des échantillons est passé à l'évaporateur rotatif pour enlever toute trace d'acétone. L'échantillon est ensuite aliquoté dans des tubes préalablement pesés, et traité dans un dessiccateur industriel. Une fois les tubes peser pour connaitre la quantité de matière présente, 5 tubes serviront à calculer la teneur en polyphénols en équivalent acide gallique dans nos échantillons déshydratés. Pour cela ils sont réhydratés complètement dans du PBS avant d'être dosés par la méthode colorimétrique au Folin contre une gamme d'acide gallique.

Des différences significatives ayant été constatées lors de certaines extractions, nous avons décidé d'utiliser ce dosage pour administrer toujours la même concentration (en équivalent acide gallique ou GAE) aux souris. A noter que l'on observe, dans certain tubes, des résidus résistant à la solubilisation, mais qui ne semble pas affecter de manière significative la concentration en polyphénols attendue dans l'échantillon resolubilisé.

Etude des paramètres lipidiques.

A Partir du sérum collecté chaque semaine, et au moment de l'euthanasie, nous avons dosé différents paramètres lipidiques comme : les triglycérides, le cholestérol total, le LDL/VLDL-c et le HDL-c. Pour cela nous avons utilisé les kits colorimétriques commerciaux suivant : le kit de Biovision de dosage du LDL/VLDL et HDL ; et le kit de dosage des triglycérides toujours de chez Biovision.

Pour le dosage des LDL/VLDL et HDL, une première étape de précipitation du LDL/VLDL permet d'obtenir la fraction du sérum contenant les HDL. Le couple cholestérol/esterase et cholestérol/oxidase permet alors de libérer le cholestérol contenu dans la fraction et d'oxyder le cholestérol libre produisant un chromogène identifiable à 570nm. Ceci est réalisable sur la fraction contenant

le HDL et la fraction contenant le LDL/VLDL. Les échantillons de HDL étaient dilués au 1/10^{ème} et au 1/20^{ème}, l'échantillon de cholestérol total était dosé au 1/50^{ème}, et les Tryglicérides totaux (le kit fonctionne sur le même principe) étaient dosés avec une dilution au 1/50^{ème} ou au 1/100^{ème}.

Quantification de la surface des lésions d'athérosclérose.

Après extraction de chaque artère, nous avons effectué une coupe longitudinale des artères, puis nous avons photographié les aortes avec un étalon interne (règle). Par la suite, nous avons utilisé le logiciel libre imageJ pour quantifier manuellement la surface totale des plaques, que nous avons ramenée à la surface totale de l'artère dans chaque cas.

Immunofluorescence dirigée contre le CD68 sur les arcs aortiques de souris apoE ko :

Les arcs aortiques sont coupés au cryotome en section de 12µM et placés sur des lames traitées (type gold+). Les coupes sont ensuite gardées à -20°C jusqu'au marquage.

Dans un premier temps les lames sont fixées au PFA 4% glacial 15mn, avant d'être rincées au PBS (3*5mn) et on dépose l'anticorps primaire (rat anti souris CD68 ; Abd serotech MCA 1957) sur la nuit, en chambre froide dans une chambre humide. L'anticorps primaire est dilué au 1/100^{ème} dans du PBS avec 0,5% m/v de lait en poudre.

Après rinçage au PBS (3*5mn), on dépose le secondaire (chèvre anti-rat IgG- Alexa fluor 488 ; Ab 150165, lot GR 248-990-1) pendant 1h30 à l'obscurité dans une chambre humide. Le secondaire est dilué au 1/400^{ème} dans du PBS avec 0,5% m/v de lait en poudre. Après lavage au PBS, on marque les noyaux au DAPI, et on monte les lames avec un liquide de montage spécial fluorescence. L'acquisition des images a lieu sur un microscope à fluorescence.

les images sont prises avec l'objectif f4 puis quantifiées par image en convertissant les images en 8 bit nuance de gris, et en mesurant la surface et l'intensité cumulé des pixel au niveau des plaque. Pour les calculs de l'intensité corrigée moyenne, on prend une image et on mesure séparément l'air et la densité de chaque plaque. On mesure aussi l'air et l'intensité du bruit de fond. L'air pour chaque plaque est mesuré par la formule :

$$\text{Intensité corrigé} = \left(\frac{\text{intensité total (plaque)}}{\text{air (plaque)}} \right) - \left(\frac{\text{intensité total (bruit de fond)}}{\text{air (bruit de fond)}} \right)$$

Le score de chaque plaque est ensuite moyenné pour avoir le score utilisé pour chaque souris dans les calculs.

Oil Red O sur les arc aortiques de souris apoE ko :

Les coupes sont les mêmes que celles utilisées pour immunofluorescence. La technique utilisée ici est adaptée de *A. Mehlem et al. (Nature Protocols vol.8, No.6, 2013)* . Rapidement les coupes sont laissées 10 mn à température ambiante, puis immergées pendant 10mn à température ambiante dans un mixte préparé avec 6mL de solution de red oil stock (voir papier) et 4mL d'eau miliQ que l'on a préalablement laissé reposer 10mn à 4°C et filtré juste avant utilisation.

On rince au PBS (2*3mn) puis on immerge les coupes dans de l'Hématoxyline de Meyers (15mn). Finalement on rince (2*3mn) au PBS et on monte les coupes avant observation. Les images sont acquise en lumière transmise sur le même microscope, et au même grossissement. Les coupes sélectionnées sont anatomiquement proches de celles utilisées pour l'immunofluorescence.

Test de lyse des globules rouges (test KLR pour voir les capacités antioxydantes des plasma de souris ApoE ko) :

Le test KLR repose sur la lyse des globules rouges en réponse à un générateur de ROS (ici l'AAPH). Le sang utilisé dans nos expériences provient de donateurs volontaires en bonne santé et a été collecté dans des tubes EDTA. Une première étape de lavage des globules rouges consiste à précipiter les globules rouges du sang total par centrifugation (10mn à 500g) le surnageant est éliminé et remplacé par un même volume de solution de NaCl 0,15M pour tout resolubiliser. L'opération est répétée 3 fois (500g/5mn). Finalement les globules rouges concentrés sont dilués au 1/50^{ème}. 100µL de cette solution de globules rouges sontensemencés dans des plaques 96 puits, puis on rajoute les sérums de souris à tester (135µL dilués au 25^{ème}/ 50^{ème}/ ou 100^{ème}). Enfin on rajoute en même temps les 40µL d'AAPH (préparés en diluant 100mg de poudre commerciale dans 1mL de NaCl 0,15M).

La lecture est effectuée toutes les 10mn après homogénéisation (double orbital) à 450 ou 620 nm pendant 12h. La température est fixée à 37°C. Enfin, la comparaison des échantillons a lieu à partir du temps de demi-hémolyse.

lyse des tissus:

Les tissus stockés à -80°C ont été lysés dans du tampon Tris-HCL (PH8,5) 20mM avec une lyse mécanique (tissus lyzer, burst de 30s-1mn avant de remettre à 4°C et on répète l'opération jusqu'à lyse totale du tissu). Le surnageant est ensuite centrifugé à 10 000g et aliquoté en tubes de 25µL pour analyse ultérieure (sauf protéasome qui été réalisé dans l'heure).

dosage des carbonyles tissulaires:

Après un dosage Bradford, on prépare 13 μ L de solution protéique équilibrée (voir le maximum de protéines déposables en fonction de l'échantillon le moins concentré.) on rajoute dans tous les tubes 13 μ L de SDS 12%, puis 26 μ L solution de DNPH (39,8mg de poudre de DNPH et 1mL d'acide trifluoroacétique QSP 10mL avec de l'eau milliQ) après exactement 10mn on arrête la réaction avec 22 μ L de solution de neutralisation (30% glycérol dans du tampon TRIS 2M). Après homogénéisation 25 μ L de solution est utilisé pour réaliser un western blot classique avec gel de 8% et membrane PVDF-FL. Nous avons utilisé un anticorps primaire rabbit anti-DNPH au 1/1000^{ème} sur la nuit, et révélé par chemiluminescence avec un secondaire couplé à la HRP classique. Un gel de coomassie permet aussi de vérifier si les protéines sont convenablement équilibrées.

Dosage des AOPP tissulaires:

Le dosage des AOPP est un dosage colorimétrique face à une gamme de Chloramine T. La gamme de chloramine T est réalisée par dilution en cascade à partir d'une solution à 100 μ M dans de l'eau. 100 μ L d'échantillons dilués (1/5^{ème} ; 1/10^{ème} et 1/20^{ème}) ou de la gamme de chloramine sont déposés en p96 puits, puis on rajoute 10 μ L d'acide acétique pur, puis 5 μ L d'iodure de potassium (1,16mM dans de l'eau). La lecture se fait à 340nm. Les résultats sont normalisés par la quantité de protéines dosée par Bradford.

Activité du protéasome dans les tissus des souris apoE ko :

On dépose 15 μ L de lysat tissulaire dans une plaque 96 puits sur glace. On rajoute 85 μ L de solution de LLVY/MCA 25 μ M dans du TRIS 25mM PH 7,5. Les échantillons sont testés en duplicata avec un puits supplémentaire où l'on rajoute 10 μ L d'inhibiteur commercial de la LLVY. L'activité est mesurée par 60 cycles de 10 secondes par fluorescence à ex 395nm/em 440, à 37°C. On soustrait ensuite l'activité aspécifique (avec l'inhibiteur) à l'activité totale moyenne de l'échantillon, puis on normalise par la quantité de protéines.

Résultats

1°) Impact des ERP de *Doratoxylon apetalum*, *Antirhea borbonica* et de la curcumine sur des cellules endothéliales stressées avec des LDL oxydées

I,1°) Introduction :

L'oxydation des LDL fait partie des mécanismes pathologiques majeurs qui participent au développement des plaques d'athérosclérose. On rappellera notamment leur rôle dans l'initiation de la dysfonction endothéliale, via l'établissement d'un stress oxydant intracellulaire à l'origine de l'apoptose de la cellule endothéliale. La dysfonction endothéliale participe de plusieurs façons à la progression de l'athérosclérose, que nous avons déjà détaillée dans l'introduction. Pour rappel, un endothélium activé favorise le recrutement sur site des macrophages, via l'augmentation de molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) et joue probablement un rôle indirect dans l'accumulation et l'oxydation des LDL à cause de l'augmentation des jonctions de fuite de l'endothélium. La dysfonction endothéliale joue un rôle majeur sur la production de NO, qui a une influence majeure dans le tonus vasculaire, la signalisation cellulaire mais aussi un rôle antithrombotique; enfin, la dysfonction endothéliale peut favoriser la formation d'un thrombus superficiel. Certains dérivés de l'oxydation des LDL comme le 4-HNE ou le MDA sont capables à eux seuls d'induire une partie des réponses cellulaires induites par des LDL oxydées, il est donc probable que l'effet des LDL oxydées implique le stress oxydatif. Une manière efficace de lutter contre les effets délétères des LDL oxydées serait donc d'utiliser des molécules antioxydantes capables à la fois de limiter l'oxydation des LDL ou leurs effets sur les cellules endothéliales.

La principale source d'apport en antioxydants chez l'humain provient des polyphénols d'origine alimentaire. Les polyphénols forment une grande famille de molécules d'origine végétale qui assure de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. La grande diversité structurale des polyphénols explique leurs propriétés qui peuvent être assez différentes d'un groupe de polyphénols à l'autre. Certains polyphénols sont de meilleurs antioxydants, d'autres activent des voies cellulaires et certains sont de bons antibiotiques. Bien que les effets de polyphénols individuels commencent à être étudiés, il reste difficile de purifier

ou synthétiser certains d'entre eux, ce qui rend compliqué les expériences se concentrant sur un ou plusieurs polyphénols peu étudiés. En plus de cela, la matrice végétale extraite avec les polyphénols pourrait jouer un rôle dans leur stabilité et/ou absorption et n'est donc pas à sous-estimer.

Le but de cette thèse était d'étudier le potentiel d'extraits riches en polyphénols de deux plantes *Antirhea borbonica* et *Doratoxylon apetalum*. Ces plantes endémiques de l'île de la Réunion ont été sélectionnées car elles sont riches en polyphénols, possèdent de bonnes capacités antioxydantes et ont déjà été utilisées en pharmacopée traditionnelle. L'idée était d'étudier les capacités antioxydantes et anti-inflammatoires d'ERP de ces deux plantes sur des cellules endothéliales stressées par des LDL oxydées. Dans un premier temps nous avons testé la capacité de ces extraits à inhiber *in vitro* l'oxydation des LDL. Puis nous avons travaillé sur un modèle de cellules endothéliales humaines et montré que les ERP de nos extraits sont capables d'empêcher l'oxydation des LDL par des cellules et enfin qu'ils étaient aussi capables de diminuer l'augmentation de la production intracellulaire de ROS, induite par des LDL oxydées.

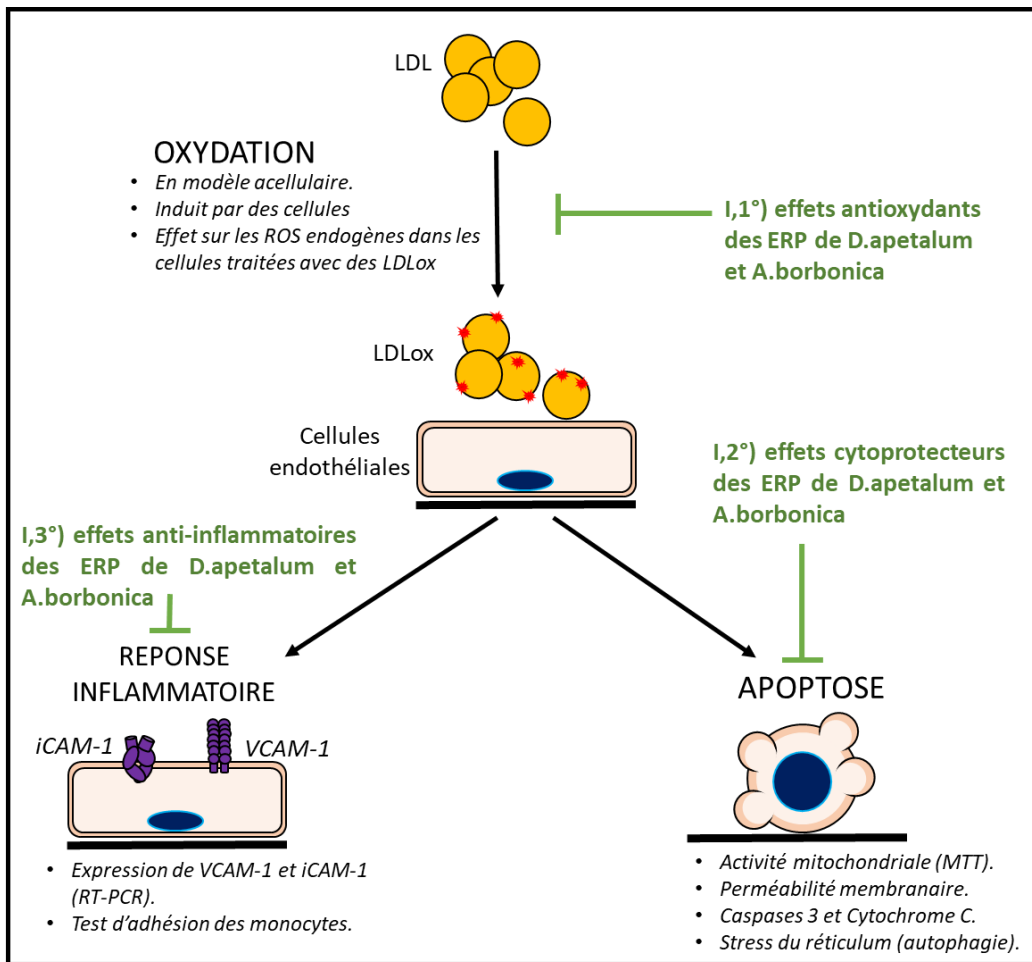
Les LDL oxydées sont capables d'induire l'apoptose 16-48h après stimulation des cellules endothéliales, nous avons donc testé les effets cytoprotecteurs de la co-incubation avec les ERP de *D. apetalum*, d'*A. borbonica* ou de la curcumine.

Enfin, nous nous sommes intéressé aux capacités anti-inflammatoires de ces ERP dans un modèle *in vitro*.

Un schéma récapitulatif est présenté **annexe 1**.

I,2°) Extraction des polyphénols issus de A.borbonica et D.apetalum

Les spécimens végétaux *A.borbonica* et *D.apetalum* ont été formellement identifiés par des botanistes. Les feuilles ont été séchées par chaleur sèche sur la nuit puis broyées en fine poudre avant stockage. Cette poudre est ensuite remise en suspension dans de l'éthanol aqueux à 70% pendant une heure (sous agitation en chambre froide). La solution obtenue est ensuite centrifugée 10mn à 3500 rpm (4°C) deux fois, pour éliminer tous les débris, homogénéisée puis aliquotée par 50µL et congelée à -80°C. La concentration en polyphénols totaux est estimée par un test de Folin, qui utilise les propriétés réductrices des polyphénols. Le pouvoir réducteur total de l'extrait est comparé à celui de l'acide gallique, d'où l'expression de la molarité en équivalent acide gallique (*Gallique Acide Equivalent*, ou GAE). La **figure 19** montre que l'ERP de *D. apetalum* semble avoir un



Annexe 1 : Plan des Expérimentation in vitro

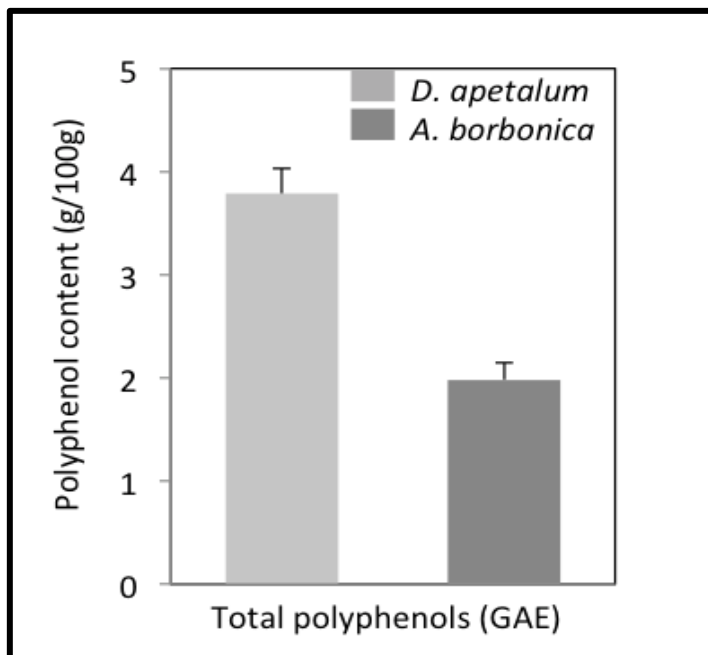


Figure 19 : Concentration en polyphénols en g GAE par 100g de plante.

pouvoir réducteur total presque deux fois supérieur à celui de *A. borbonica*. Cela peut être dû soit à une concentration plus importante en polyphénols, soit à la présence d'espèces de polyphénols avec un plus fort pouvoir réducteur chez *D.apetalum*.

En ce qui concerne la curcumine utilisée dans certaines expériences, il s'agit d'une solution de poudre de curcumine commerciale (Sigma) pure à 99%, diluée dans de l'acétone 70%, aliquotée, puis conservée à -80%. La curcumine a été largement étudiée dans la littérature et sert de point de comparaison avec nos ERP.

I,3°) Effets antioxydants des ERP de *D. apetalum*, d'*A. borbonica* et de la curcumine.

Les LDL sont sensibles à l'auto-oxydation en présence d'oxygène, la réaction d'oxydation est accélérée en présence de métaux de transition comme le cuivre ou le fer. Pour tester la capacité des ERP d'*A. borbonica* et de *D. apetalum* à empêcher l'oxydation des LDL, nous avons incubé des LDL dans du PBS en présence de 4 μ M de CuSO₄ pendant 2h à 37°C. Nous avons d'abord tenté de mesurer les diènes conjugués, ils sont facilement mesurables à λ 234 nm. Leur détection, peu spécifique et peu sensible, a surtout une valeur indicative.. Il est apparu rapidement que quelque chose faussait les résultats, et après avoir fait un spectre d'absorption des deux ERP, nous avons observé qu'ils absorbent aux alentours de 200-300 nm. Nous avons donc doser les hydroperoxydes à 560nm par la méthode du xylénol orange (voir matériel et méthode). Les résultats présentés sur la **Figure 20A** montrent que les deux ERP sont capables de diminuer la quantité d'hydroperoxydes générés durant l'auto-oxydation des LDL, à 50 et 100 μ M, et que la curcumine est efficace à toutes les concentrations testées (25, 50 et 100 μ M). On peut aussi noter que l'ERP de *D. apetalum* est significativement plus efficace que celui d'*A. borbonica* à 50 μ M (85% \pm 6,8 d'inhibition de l'oxydation pour l'ERP de *D. apetalum*, contre 23% \pm 15,4 pour *A. borbonica*). Nos deux extraits, ainsi que la curcumine, sont capables de limiter efficacement l'oxydation des LDL *in vitro* en présence de traces de de CuSO₄. Nous avons ensuite travaillé sur l'oxydation des LDL par des cellules endothéliales avec un modèle déjà en place dans notre équipe, les cellules HMEC (Human Microvascular endothelial cells), Après ensemencement des HMEC à la densité adéquate, les HMEC ont été déprivées en sérum la nuit, puis traitées avec avec des LDL oxydées et/ou nos ERP. Le surnageant est ensuite récolté, centrifugé pour éliminer les cellules flottantes et les débris cellulaires, puis conservé à -20°C ou bien analysé directement par la technique des TBARS (voir

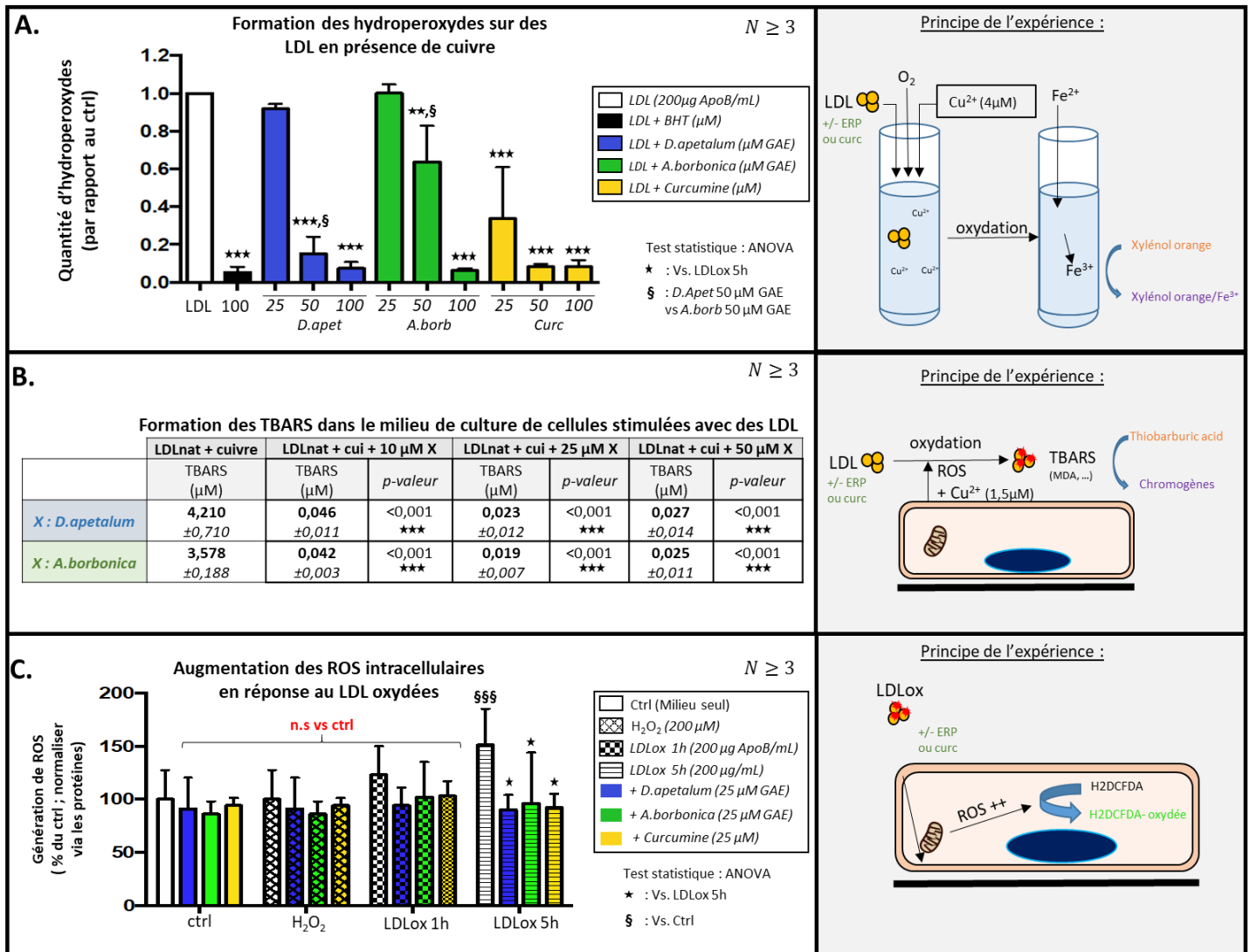


Figure 20 : Impact des ERP de *D.apetalum* et *A.borbonica* sur l'oxydation des LDL et sur l'augmentation intracellulaire de ROS induites par des LDL oxydées.

L'oxydation des LDL est un processus naturel en présence d'oxygène, mais il est facilité par les métaux de transition comme le cuivre. Dans un premier temps, nous avons observé la formation d'hydroperoxydes due à l'auto-oxydation des LDL dans du PBS en présence de cuivre et les capacités antioxydantes des nos deux ERP et de la curcumine en utilisant la technique du Xylénol orangé. (A) Nous avons ensuite vérifié que les ERP étaient aussi capables d'inhiber l'oxydation des LDL (200µg apoB/mL) induite par des cellules endothéliales en présence de traces de cuivre. Pour cela, les surnageants ont été récoltés pour une quantification des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). (B) Enfin, Les LDL oxydées ont la capacité d'induire un stress oxydant intracellulaire. Nous avons mis en évidence une augmentation des ROS intracellulaires en présence de LDLox et un effet protecteur de nos ERP et de la curcumine. (C) Les données sont représentées par la moyenne avec l'écart-type.

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel PRISM (ANOVA paramétrique), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et de même pour §. Les résultats sont représentatifs d'au moins $N=3$ expériences indépendantes.

matériel et méthode). Les cellules vont oxyder les LDL par leur production de ROS, en présence de faibles quantités de CuSO_4 , qui joue ici un rôle de catalyseur. Les résultats présentés en **Figure 20B** montrent une diminution significative des produits d'oxydation lipidique dès que l'on ajoute nos ERP. Aucune différence significative d'efficacité n'est observable entre les deux ERP, une raison pourrait être que les doses les plus faibles testées ($10\mu\text{M}$ GAE) semblent déjà inhiber complètement l'oxydation des lipoprotéines. Il a déjà été publié que des LDL minimalement oxydées étaient capables d'augmenter la production de ROS par la mitochondrie. Nous avons donc voulu vérifier si nos ERP pouvaient inhiber les ROS produits à l'intérieur de la cellule. Pour cela nous avons déprivé des HMEC en sérum sur la nuit, nous avons pré-stimulé nos cellules deux heures avec nos ERP à $25\mu\text{M}$ puis nous avons rajouté dans le milieu des LDL oxydées ($200\mu\text{g}$ d'ApoB/mL) pendant 1h ou 5h (pour voir si on avait une augmentation très précoce des ROS à 1h) avant de laver les cellules et de rajouter la sonde H2DCF-DA qui réagit avec les ROS intracellulaires (H_2O_2), s'oxyde et génère une fluorescence mesurable.. Après la mesure de la fluorescence émise, la concentration des protéines extraites est évaluée afin de normaliser les résultats obtenus dans les différentes condition. En contrôle positif, nous avons choisi l' H_2O_2 capable d'activer directement la sonde. Pour ce protocole, les cellules sont uniquement pré-stimulées pendant 1h avec les polyphénols puis rincées avec du milieu, avant d'ajouter la sonde. Après incorporation de la sonde on change le milieu pour $200\mu\text{M}$ de H_2O_2 pendant 30 min. avant de lyser les cellules puis de lire la fluorescence et de doser les protéines. Les résultats présentés en **Figure 20C** ne montrent aucune différence significative dans la quantité de ROS générée lors de l'incubation avec le H_2O_2 pendant 30 min. ou avec les ERP et la curcumine seuls pendant 5h. De même on n'observe aucune différence par rapport au contrôle dans le groupe traité avec les LDLox pendant 1h. En revanche, dans le groupe traité avec des LDL oxydées pendant 5h on a observé une augmentation significative de la production de ROS, de l'ordre de $151\% (\pm 31 ; n=10)$ par rapport au contrôle. De plus lorsque l'on rajoute les ERP on observe une inhibition de cet effet (soit *A. borbonica* : $91\% \pm 48$ du contrôle ; *D. apetalum* : $91\% \pm 14$ du contrôle et curcumine : $92\% \pm 13$). Pour vérifier que la captation des LDL n'était pas affectée par les polyphénols utilisés, nous avons marqué des LDL avec de la carbocyanine (voir matériel et méthode) puis nous avons suivi leur absorption par les cellules endothéliales avec ou sans les polyphénols. Comme présenté en **Figure 21**, aucune différence significative n'est observable entre les différents groupes.

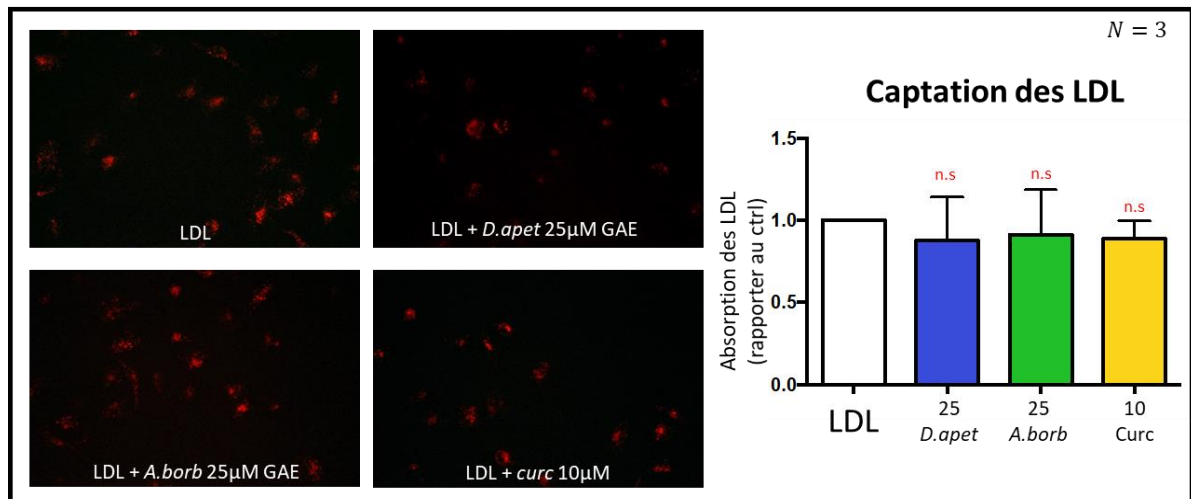


Figure 21: Impact des ERP de *D. apetalum* et *A. borbonica* ainsi que la curcumine sur l'absorption des LDL

Pour étudier l'absorption, des cellules endothéliales (HMEC) ont été déprivées en sérum sur la nuit avant d'être stimulées avec des LDL marquée aux carbocyanines en présence ou non de nos ERP ou de la curcumine. Après incubation le milieu est jeté et la fluorescence contenue dans les cellules mesurée après lyse. Cette fluorescence est normalisée avec la concentration en protéines. Les résultats montrent la valeur moyenne de fluorescence (avec l'écart-type) rapporté à la fluorescence observée dans les puits traités avec les LDL fluorescentes seules (les puits contrôles sans LDL n'ont aucune fluorescence détectable).

Les statistiques sont réalisées par un test Anova paramétrique. Les résultats sont représentatifs de N=4 expériences indépendantes.

Ces résultats pris dans leur ensemble permettent de montrer que les ERP de *D. apetalum* et d'*A. borbonica* sont capables de limiter l'oxydation des LDL et d'inhiber en partie le stress oxydant intracellulaire induits par des LDL déjà oxydées sur des cellules endothéliales.

I,3°) Effets cytoprotecteur des ERP de *D.apetalum*, *A.borbonica* et de la curcumine

Les LDL minimalement oxydées sont capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales en culture à partir d'une certaine concentration. Ce phénomène participe probablement *in vivo* à la dysfonction endothéliale, la progression des plaques d'athérosclérose et la formation de thrombus luminal. Ces phénomènes impliquent un stress oxydant et un stress du réticulum endoplasmique, puis une dérégulation de l'homeostasie calcique qui aboutit à l'apoptose aboutissant à l'apoptose des cellules par la voie intrinsèque mitochondriale via la libération du cytochrome C et du facteur apoptotique AIF. Nous avons donc testé le potentiel cytoprotecteur de nos ERP sur des HMEC à sub-confluence, puis nous les avons déprivées sur la nuit pour permettre le captage des LDL oxydées, et nous les avons traitées avec une dose cytotoxique (200 µg ApoB/mL) de LDL oxydées aux UV/Cuivre (voir matériel et méthode) jusqu'à observer 50% de mortalité dans nos puits (ce qui prend entre 24 et 48h en fonction des lots de LDL). Pour toutes les expériences, nous avons choisi de pré-stimuler les cellules avec nos ERP pendant 1h, puis de les garder dans le milieu lors de la co-incubation avec les LDLox. Il était rationnel de laisser un délai raisonnable au cas où une partie de l'effet protecteur dépendrait de l'activation de voies de signalisation. Nous avons étudié l'activité mitochondriale, comme reflet indirect de l'état apoptotique des cellules. La viabilité des cellules a été évaluée par le test MTT, qui est un test classique reflétant l'activité succinate déshydrogénase des mitochondries c'est à dire la respiration mitochondriale—(**Figure 22A**). La condition LDL oxydées montre 42,7 ($\pm 7,5$) % de survie par rapport au contrôle après 24h de stimulation. La co-stimulation avec chaque ERP a montré une augmentation significative de la viabilité cellulaire pour des concentrations ≥ 25 µM GAE. L'amplitude maximale de l'effet protecteur apparaît être la condition LDLox + *D.apetalum* à 50 µM GAE avec une augmentation de la viabilité cellulaire de +30 ($\pm 7,12$) %. L'ERP d' *A. borbonica* atteint un maximum d'efficacité dès 25µM GAE de +23 ($\pm 2,89$) % de viabilité. La curcumine, est aussi capable de protéger de façon significative les HMEC de l'action des LDLox à 10µM avec +19 ($\pm 9,54$)% de viabilité. Les polyphénols seuls n'affectent pas

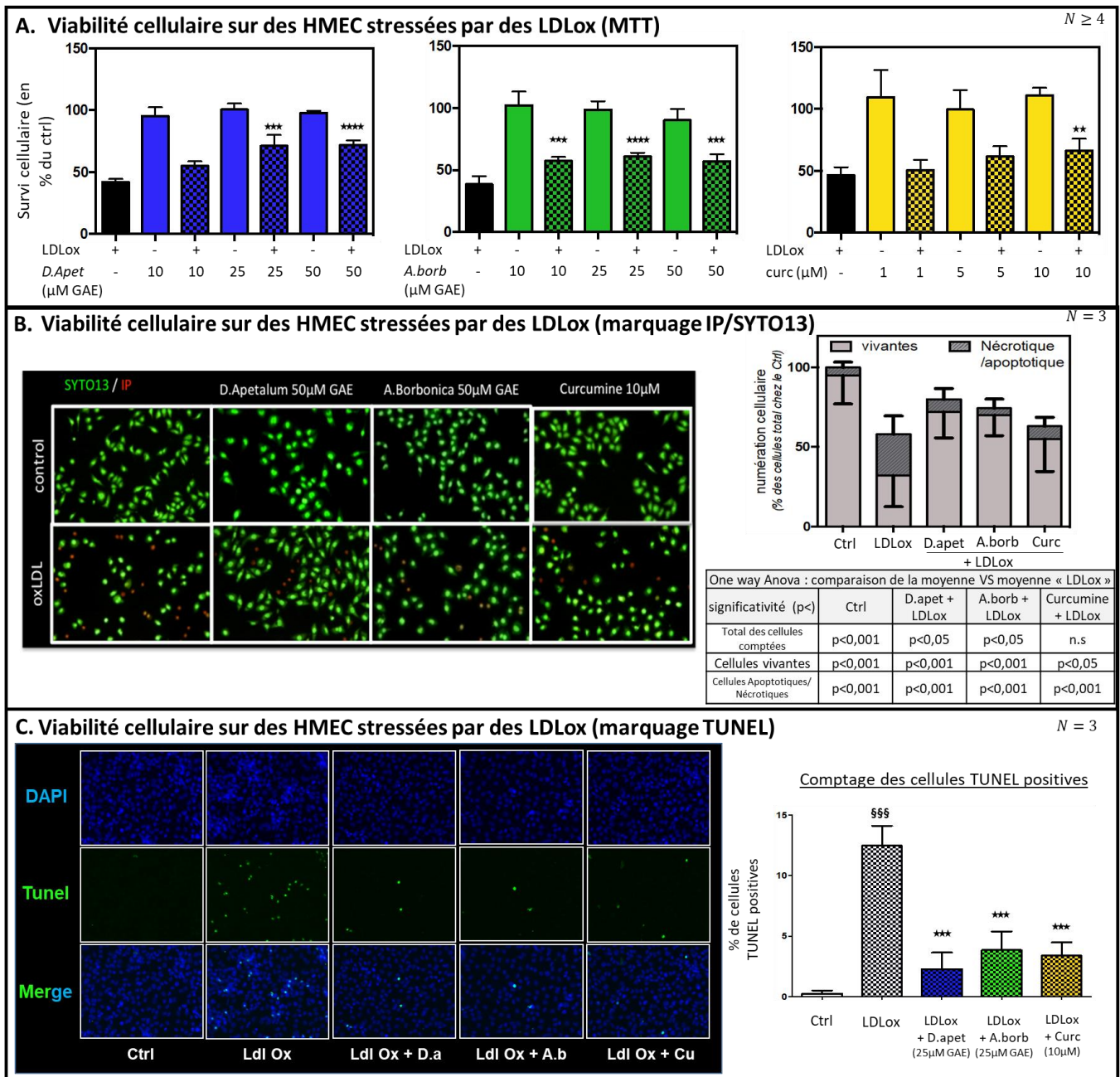


Figure 22 : Effets cytotoxiques des LDL oxydées sur les cellules endothéliales et effet cytoprotecteur des ERP de *D.apetalum* et *A.borbonica*.

Les LDL oxydées ont un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales à 200μg ApoB/mL pendant 24-48h (en fonction du lot de LDL). Pour vérifier si nos extraits étaient capables de protéger les cellules endothéliales de ce stress apoptotique, nous avons pré-incubé nos ERP 1h avec nos cellules, avant de rajouter les LDL oxydées dans le milieu. La viabilité cellulaire à la fin du traitement a été observée via l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (A.) et par un double marquage avec le SYTO13 (permeant, reconnaît les acides nucléiques) et l'IP (non-permeant ; reconnaît les acides nucléiques.) (B.). Enfin, l'équipe a aussi réalisé un marquage TUNEL et dénombrer le nombre de cellules TUNEL positives (apoptotique) (C.). Les résultats représentent la valeur moyenne avec l'écart-type supérieur. Les résultats statistiques sont obtenus par des tests one-way ANOVA avec l'annotation : * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 en comparant au groupe **LDL oxydées** (A. et C.) et de même pour § qui compare le groupe au groupe **contrôle (Ctrl)** (C.). Les résultats représentent au moins 3 expériences indépendantes.

significativement la viabilité des cellules endothéliales aux doses utilisées. Pour conforter ces résultats, nous avons réalisé un double marquage avec deux sondes fluorescentes qui marquent les noyaux en fonction de l'intégrité membranaire. Le colorant perméant (SYTO13) et l'iodure de propidium (IP), non perméant (**voir Figure 22B**). En cohérence avec les résultats de MTT, la co-stimulation des ERP avec les LDLox augmente significativement la quantité de cellules vivantes comptées, tout en diminuant la quantité de cellules apoptotiques. Avec les LDLox, il y avait plus de cellules apoptotiques/nécrotiques que dans le contrôle (26% vs 5%) ce qui est probablement sous-estimé car la quantité de cellules totale comptée dans la condition LDLox est 42% inférieure à celle du contrôle, ce qui est probablement attribuable au décollement des cellules endothéliales. La co-incubation avec l'ERP de *D. apetalum* à 50µM GAE augmente le pourcentage de cellules vivantes de 32% à 72% ($\pm 9,54$) et diminue la quantité de cellules apoptotiques de 26% à 8 ($\pm 2,4$) %. De même, la co-incubation avec l'ERP de *A. borbonica* augmente le taux de cellules vivantes à 70 ($\pm 4,3$) % et diminue le compte de cellules apoptotiques à 9 ($\pm 2,1$) %. Enfin, la curcumine à 10µM permet d'augmenter la quantité de cellules vivantes à 55 ($\pm 9,2$) % et diminue le nombre de cellules apoptotiques compté à 8 ($\pm 2,5$) %. Enfin, nous avons réalisé un marquage TUNEL sur des HMEC traitées comme précédemment (**Figure 22 C**). Les résultats montrent une augmentation significative de cellules TUNEL positives de l'ordre de 12,5 ($\pm 1,7$) % lorsque les cellules sont traitées avec les LDL oxydées seules. La co-incubation des LDL oxydées avec les polyphénols permet de réduire cette mortalité à seulement 2 ($\pm 1,3$)% dans le cas de l'ERP de *D. apetalum* à 25µM GAE ou encore à 2,3 ($\pm 1,4$) % pour l'ERP de *A. borbonica* et à 3,4 ($\pm 1,1$) % pour la curcumine. Un des mécanismes principaux par lesquels les LDL oxydées induisent l'apoptose des HMEC est la libération du cytochrome C dans le cytosol et l'activation de la caspase 3. Nous avons donc étudié si l'effet protecteur de nos ERP se situait en amont de l'activation de la caspase 3 et du relargage du cytochrome C.

Le relargage de cytochrome C dans le cytosol a été observé par immunofluorescence (**Figure 23 A**). Les cellules ont été traitées comme précédemment puis marquées avec un anticorps dirigé contre le cytochrome C. On peut observer l'organisation fibrillaire du marquage dans les cellules contrôle, marquage qui indique que le cytochrome C reste séquestré dans les mitochondries. Après 24h de traitement avec 200 µg ApoB/mL de LDL oxydées, on observe un marquage diffus dans le cytoplasme correspondant probablement à la libération du cytochrome C. L'ajout des ERP ou de la curcumine permet d'observer un

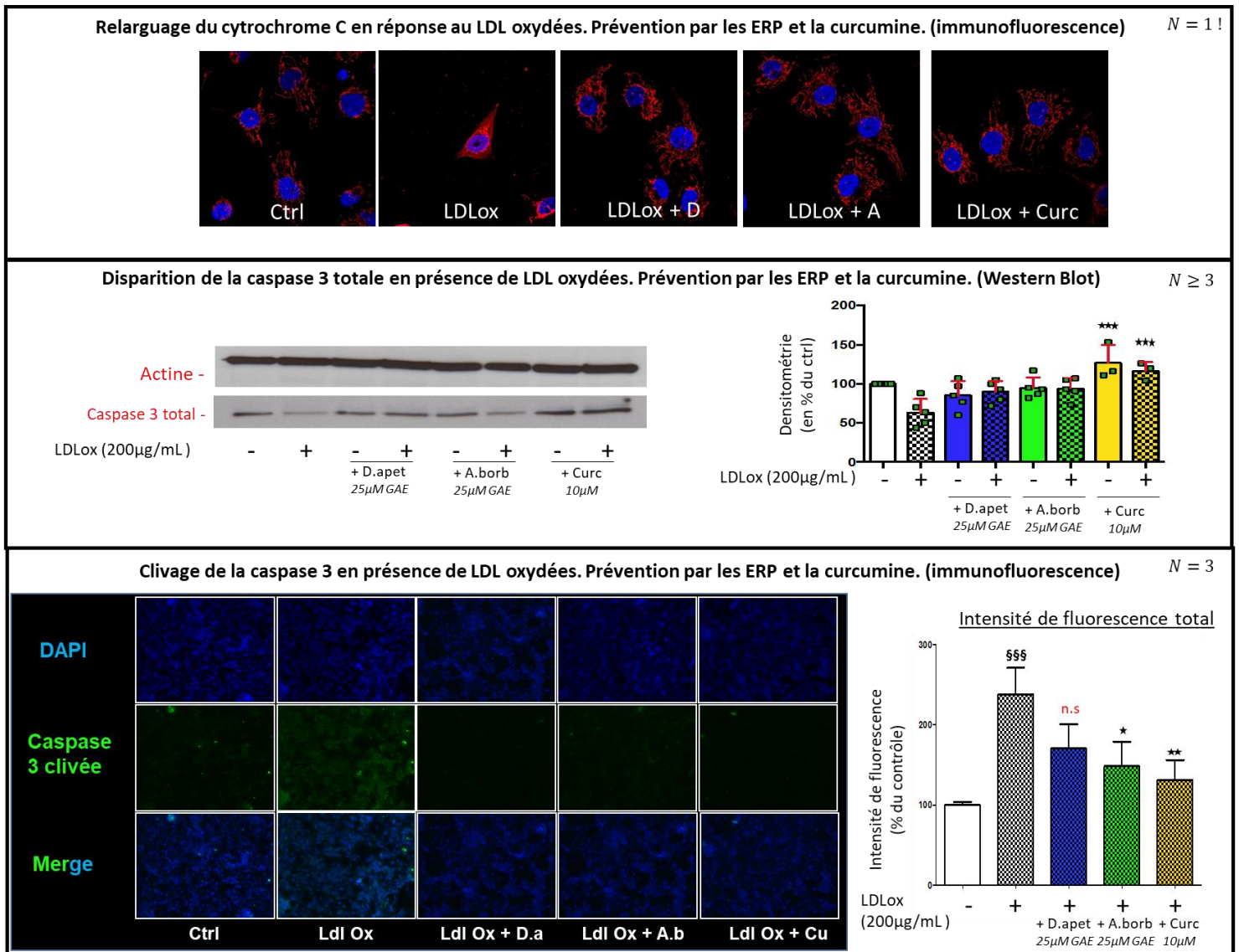


Figure 23 : aspects mécanistiques de la cytoprotection médiée par les ERP de *D. apetalum* et *A. borbonica*.

Après stimulation 24h par 200 µg d'ApoB/mL de LDL avec ou sans les polyphénols, nous avons observé la libération (flèche blanche) du cytochrome C dans le cytosol par immunofluorescence (A). Le relargage du cytochrome C contribue à l'activation de la caspase 3 clivée. On peut donc observer par western blot la disparition de la forme totale de la caspase 3 (B). La forme clivée est observable en immunofluorescence (C). Les résultats représentent la valeur moyenne avec l'écart-type supérieur.

Les résultats statistiques sont obtenus par des tests one-way ANOVA avec l'annotation : * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 en comparant au groupe **LDL oxydées** (B et C) et de même pour § qui compare le groupe observé au groupe **contrôle (Ctrl)** (B). Les résultats représentent au moins 3 expériences indépendantes (sauf pour le relargage du cytochrome C).

marquage semblable au marquage de la condition contrôle et indique que les ERP et la curcumine inhibent la libération du cytochrome C dans le cytosol.

Enfin nous avons étudié l'activation de la caspase 3, en commençant par traiter les cellules comme précédemment (20-24h). Nous avons ensuite réalisé des Western Blot à partir des extraits de protéines totales et réalisé une mesure semi-quantitative de la caspase 3 totale par densitométrie (**Figure 23 B**). On observe une diminution de l'ordre de 27 ± 17 % de la caspase 3 totale quand les cellules sont traitées avec des LDL oxydées (par rapport au cellules contrôles). L'ajout de l'ERP, de la curcumine ou de *A. borbonica* permet de limiter de manière significative le clivage de la caspase 3 total, avec une diminution par rapport au contrôle de seulement $6 \pm 13,7$ % pour *A. borbonica* et une augmentation par rapport au contrôle de $16 \pm 11,4$ % pour la curcumine. Les cellules co-traitées avec les LDLox et l'ERP de *D. apetalum* montrent une diminution non significative du clivage de la caspase 3 de $10 \pm 13,7$ %. La détection de la caspase 3 active a été réalisée par immunomarquage en utilisant un anticorps dirigé contre la forme clivée. Les images obtenues sont présentées en **Figure 23 C**. La quantification de la fluorescence totale montre une augmentation de l'activité caspase 3 clivée d'un facteur 2,38 (± 0.33) quand les cellules sont traitées avec les LDL oxydées (par rapport au contrôle). On observe un effet protecteur significatif sur le clivage de la caspase lorsque l'on co-incube les cellules avec des LDL oxydées et l'ERP de *A. borbonica* ou la curcumine. L'ERP de *A. borbonica* à $25 \mu\text{M}$ GAE permet de diminuer le clivage de la caspase à d'1,48 fois par rapport au contrôle ; et la curcumine de 1,3 fois. Enfin, l'ERP de *D. apetalum* ne permet pas de diminuer de manière significative ($p < 0,06$) l'activation de la caspase 3. Il est ici intéressant de noter que *D. apetalum* semble être le plus efficace d'un point de vue cytoprotecteur (pour chacune des trois techniques utilisées) mais diminue moins que les autres extraits l'activation de la caspase 3 (par deux techniques différentes). Il dès lors envisageable que l'ERP de *D. apetalum* agisse, au moins en partie, sur des mécanismes cellulaire capable en aval du clivage de la caspase 3.

Il est maintenant clairement établi que dans des conditions de stress (carences nutritives, oxydation, apoptotique ...) les cellules vont répondre en activant des voies d'adaptation et de survie cellulaire. Parmi ces réponses, l'autophagie a été largement décrite comme un processus de survie cellulaire par la dégradation lysosomale des organites et protéines altérés. Des travaux de l'équipe ont montré récemment que l'autophagie est activée dans les cellules vasculaires de façon concomitante à l'apoptose induite par les LDL oxydées. Afin d'évaluer si l'effet protecteur des ERP fait intervenir le processus d'autophagie nous

avons mesuré dans nos conditions expérimentales l'activation de paramètres classiques de l'autophagie. Des expériences préliminaires pour mettre en évidence la transformation du marqueur autophagique LC3-I en LC3-II et le flux autophagique (en présence de Bafilomycine A) ont été réalisées sur les HMEC pré-traitées ou pas par les ERP ou la curcumine, et stimulées par les LDL oxydées. L'analyse par western-blot a permis de retrouver (**Figure 24**) une augmentation de la forme LC3-II dans les cellules traitées avec les LDL oxydées. De façon inattendue et intéressante, nous avons observé que *D. apetalum* seul active l'autophagie et potentialise le flux autophagique induit par les LDL oxydées, pouvant ainsi expliquer son effet protecteur vis à vis de la cytotoxicité des LDL oxydées. A la différence de *D. apetalum* l'ERP de *A. borbonica* et la curcumine ne montrent pas un effet sur le flux autophagique, toutefois ces résultats n'ont été obtenus qu'à partir d'une seule expérience pour *A. Borbonica* et devront être répétés.

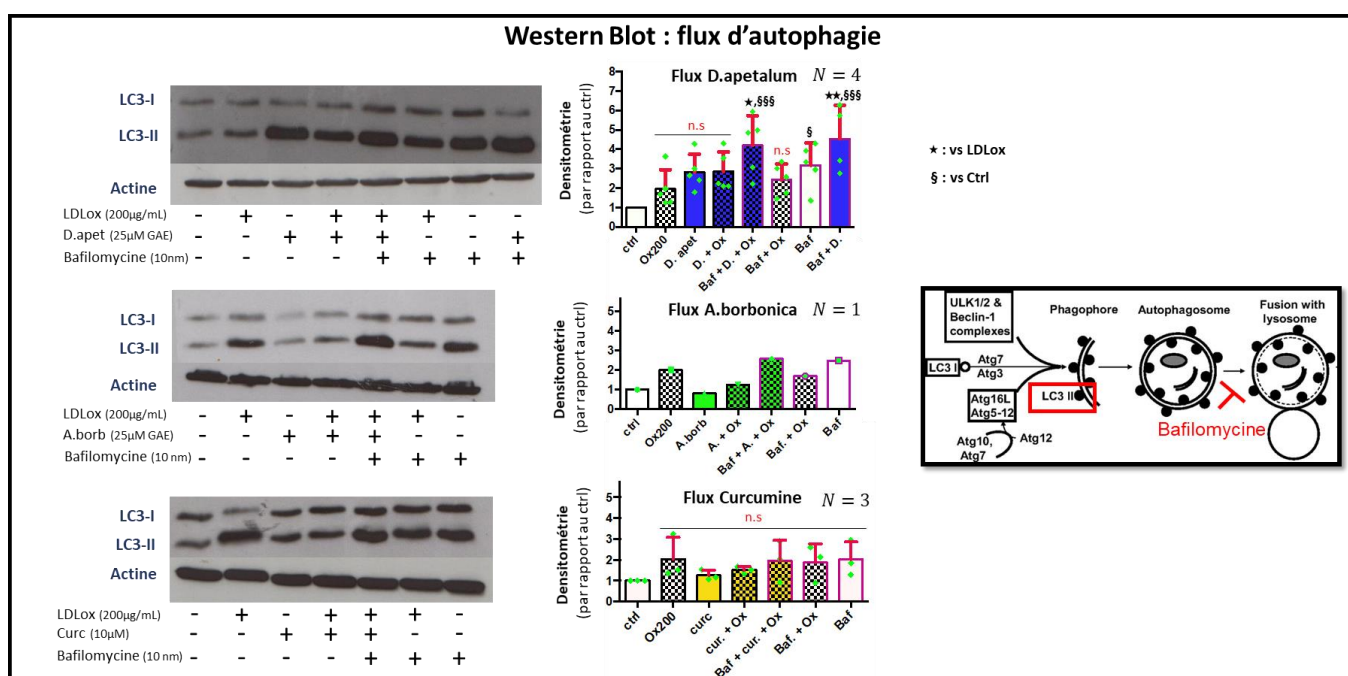


Figure 24 : Etude du flux d'autophagie dans les cellules HMEC en présence des ERP et de la curcumine et stressées par des LDL oxydées.

Les cellules ont été déprivées en sérum sur la nuit, puis prétraitées avec les polyphénols pendant 1h. Dans les conditions indiquées, il a ensuite été rajouté 10nM de Bafilomycine (un inhibiteur de la fusion endosome/lysosome : en bloquant le flux d'autophagie, les autophagosomes s'accumulent). 2h après l'ajout de polyphénols, on rajoute dans les conditions indiquées, les LDL oxydées pendant 24h puis les protéines sont extraites pour analyse en western blot.

Les résultats sont représentés via la moyenne avec son écart-type. Les résultats statistiques sont obtenus par un test ANOVA classique, avec respectivement * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, pour les tests ANOVA comparant avec la condition LDLox et de même pour § (comparant avec la condition contrôle). Les points vert représente les valeurs individuelles pour chaque expérience.

Des analyses complémentaires et plus poussées sont envisageables pour tenter d'explorer cet effet intéressant.

Enfin nous avons voulu tester jusqu'à quel moment les extraits de *D. apetalum* (plante sélectionnée pour l'étude *in vivo*) étaient capables de protéger les cellules endothéliales de l'effet cytotoxique des LDL oxydées. Pour cela nous avons traité des HMEC avec des LDL oxydées (200µg ApoB/mL) et nous avons rajouté l'ERP de *D.apetalum* à différents temps dans les milieux pour voir à quel moment l'ERP n'était plus capable d'inhiber l'apoptose induite par les LDL oxydées. Les résultats présentés **Figure 25** sont assez intéressants car ils mettent en avant deux phénomènes : le plus évident est que l'ERP de *D.apetalum* est capable de protéger les cellules endothéliales jusqu'à des stades très tardifs dans le processus d'apoptose induit par les LDL oxydées : (75,11 ± 11,88 % à T20 vs 53,98± 7.34 % pour la condition LDLox). Le second phénomène est que l'on observe une tendance, bien que non significative, à une perte de protection lorsque l'on ajoute l'ERP de *D. apetalum* après 6-8h d'incubation avec les LDL oxydées. D'autres expériences seraient nécessaires pour confirmer cette tendance, et il est aussi possible de tester d'autres ERP ou des polyphénols seuls.

1,4°) Effets anti-inflammatoire des ERP de *D. apetalum*, *A. borbonica* et de la curcumine

Il a été proposé que les LDL oxydées à faible concentration seraient capables d'induire un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales, notamment via l'augmentation de l'expression des récepteurs VCAM-1 et ICAM-1 qui permettent de recruter les monocytes circulants au niveau de la plaque³⁷⁴. Ce phénomène participe donc à la progression de la plaque et augmente donc les risques de complications. Les ERP de *D. apetalum* et *A. borbonica* sont capables de limiter l'inflammation dans des adipocytes stressés avec du LPS (composant très inflammatoire des parois bactériennes)³⁴². Nous avons donc voulu vérifier si l'ERP de *D. apetalum* était capable de diminuer l'adhésion de monocytes à la surface de cellules endothéliales stressées par des LDL oxydées.

Pour cela nous avons traité des cellules endothéliales avec de faibles doses de LDL oxydées UV/cuivre (20-50 µg/mL) pendant 13h avec ou sans l'ERP de *D. apetalum* à 25 ou 50µM GAE. Nous avons utilisé 10 ng/mL de TNF-α comme contrôle positif (une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle majeur dans l'activation inflammatoire de l'endothélium, notamment en augmentant l'expression de VCAM-1 et ICAM-1). Nous avons ensuite rajouté des cellules d'une lignée monocyttaire (les THP-1, lignée cancéreuse

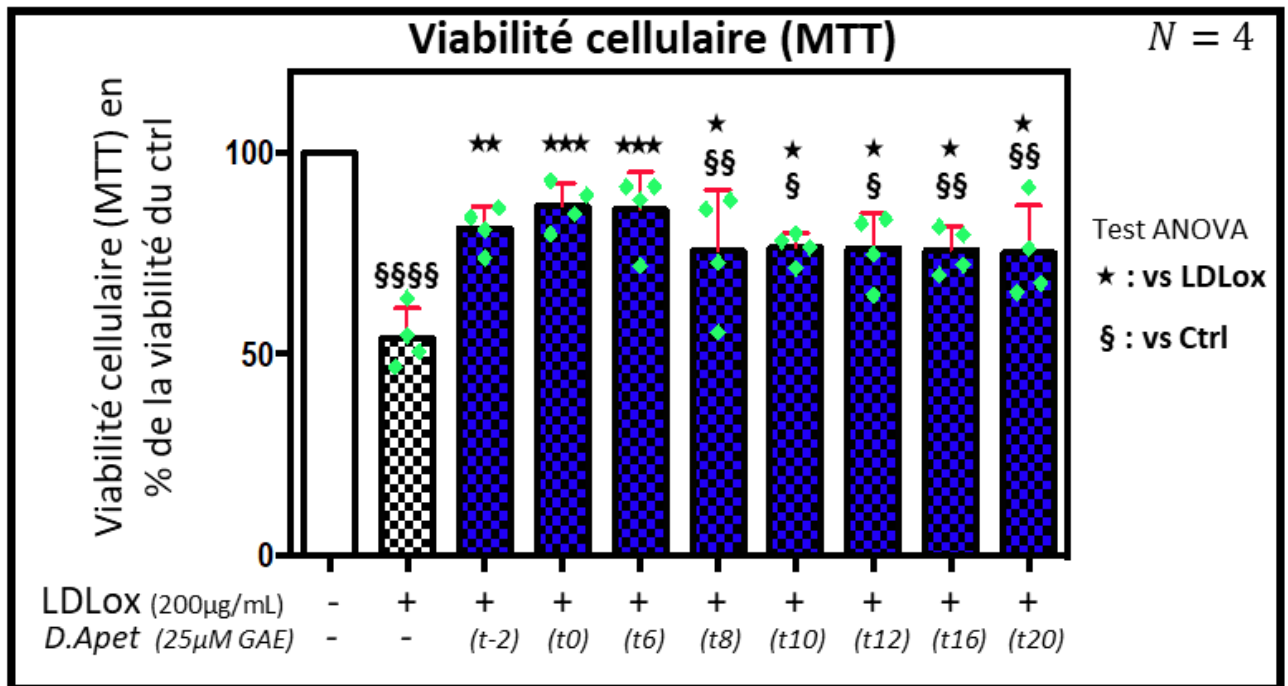


Figure 25: Viabilité cellulaire du modèle HMEC + LDLox en testant différents temps avant l'ajout de *D.apetalum* dans le milieu de culture.

Nous avons stimulé des HMEC avec des doses toxiques de LDLox (200µg ApoB/mL) pendant 24h. L'ajout des LDL a lieu à t0 puis sont rajoutés 25µM GAE de *D. apetalum* aux temps indiqués. La viabilité cellulaire est ensuite évaluée par un test MTT.

Les résultats sont représentés par la moyenne avec son écart-type.

Les résultats statistiques sont obtenus par un test ANOVA classique, avec respectivement, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001, **** p<0,0001 et de même pour §. Les losanges verts représentent les valeurs individuelles pour chaque expérience.

dérivée de leucémie), préalablement marquées au BCECF-AM (carboxyfluoresceine) sur des cellules endothéliales EA-HY926 (lignée humaine obtenue par la fusion de cellules endothéliales de cordon ombilical avec des cellules cancéreuse d'épithélium alvéolaire). La fluorescence totale et basale sont mesurées, puis, après plusieurs rinçages (voir matériel et méthode pour le protocole complet) on lit la fluorescence restante. Le rapport permet ensuite d'estimer le pourcentage de monocytes fixés sur les cellules endothéliales. Les résultats présentés **Figure 26** montrent une adhésion basale de $30 \pm 6,4\%$. Le traitement avec $10 \text{ ng/mL TNF-}\alpha$ augmente significativement l'adhésion des monocytes à $44 \pm 6,6\%$. En revanche, et malgré de nombreux essais en changeant de lots de LDL, de durée de traitement ou de concentration (données non montrées), nous n'avons jamais observé d'augmentation significative de l'adhésion des monocytes avec les LDLox. De la même manière, nous n'avons observé aucun changement significatif de l'adhésion des monocytes avec l'ERP de *D. apetalum* seul, avec des LDL oxydées ou même avec le TNF- α (data non présenté). Il est possible que les LDL soient trop oxydées par notre méthode d'oxydation UV/cuivre, qui n'activerait pas les même voies cellulaires que des LDL moins oxydées. Une autre possibilité est que ce type cellulaire ne réponde pas de la même manière aux LDL oxydées que les lignées utilisées dans la littérature. Ces résultats sont en contradiction avec des études publiées³⁷⁵ dans lesquelles les auteurs utilisaient des LDL oxydées au cuivre (même concentration mais sans les UV, avec un temps d'incubation de 24h au lieu de 2h) sur des HUVEC (lignée de cellules endothéliales). D'autres études comme celle de l'équipe de Lo Cascio met aussi en évidence³⁷⁶ une augmentation de VCAM et ICAM dans les HUVEC. Leur profile d'oxydation doser par les TBARS semble placer leurs LDL oxydées dans la catégorie des LDL faiblement oxyder décrite par le groupe de Salvayre à Toulouse. Enfin, dans une étude du groupe de Medford de 1995, l'ajout de LDL oxydées ($100\mu\text{g/mL}$, 48h) sur des HUVEC ou des HAEC (deux lignée endothéliales humaine) n'augmente pas seul l'expression membranaire de VCAM et ICAM. Cependant leurs technique d'oxydation au cuivre par dialyse semble généré plus d'oxydation comme l'indique leurs résultats de TBARS. Ces résultats semble renforcer la théorie de Lo Cascio qui propose que seul les LDL faiblement oxyder sont capable d'induire l'expression de VCAM et ICAM.

Il était initialement prévu de tester aussi l'ERP de *A. borbonica* et la curcumine, mais face à l'absence d'effet des LDL oxydées sur ce modèle *in vitro* nous avons écarté cette partie du projet. Nous avons tout de même décidé de rechercher cet effet anti-inflammatoire dans notre modèle *in vitro* présenté dans la suite de ces résultats.

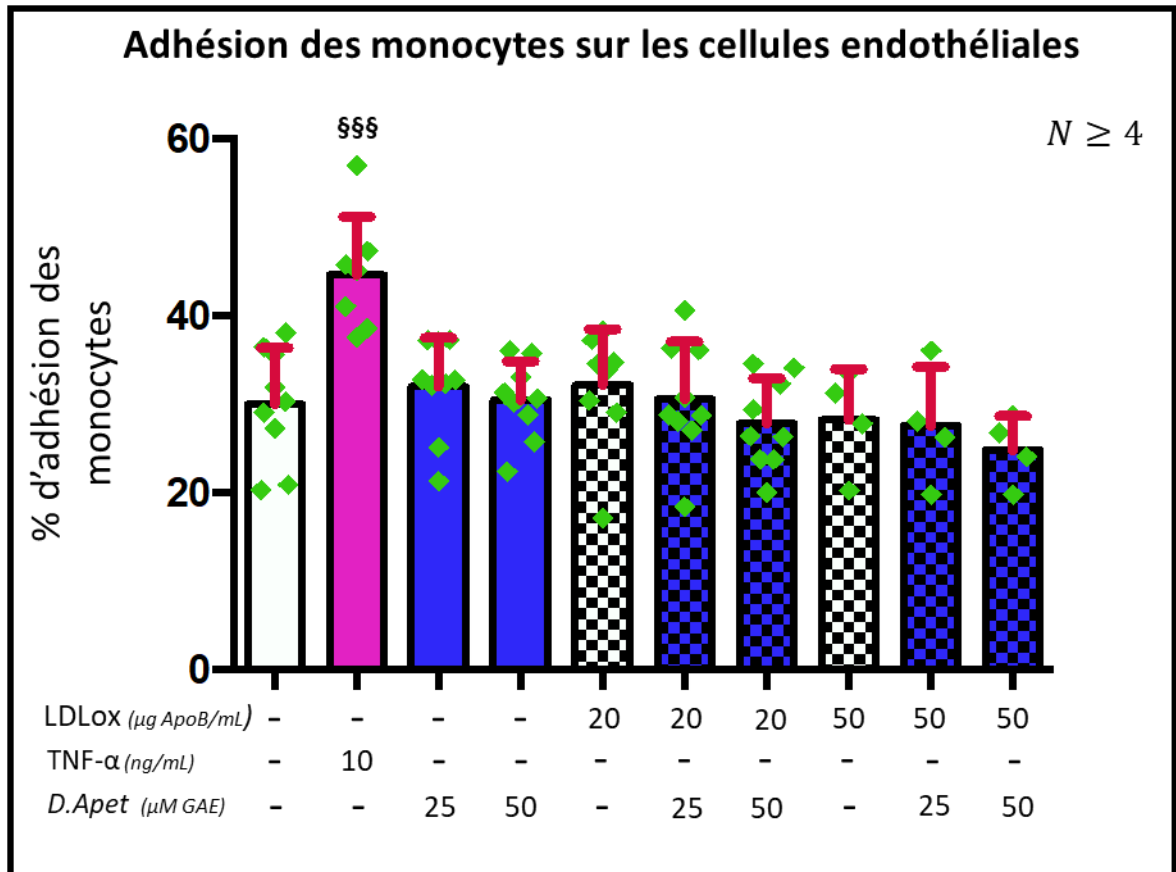


Figure 26 : Etude de l'adhésion des monocytes (lignée THP-1) sur des cellules endothéliales (lignée EA.HY926) en présence de LDL oxydées et/ou de l'ERP de *D. apetalum*.

Les cellules ont été déprivées en sérum, puis prétraitées avec les polyphénols pendant 1h. Les cellules ont été ensuite traitées avec les LDLox ou le TNF-alpha pendant 13h avant d'enlever le milieu et de rajouter les monocytes fluorescents (au BCECF-AM). Les HMEC/THP-1 sont soumis à un stress mécanique (rinçage, rotation orbitale). Les résultats présentent le % d'adhésion moyen des monocytes avec l'écart-type.

Les résultats statistiques sont obtenus par un test ANOVA classique, avec §§§ : $p < 0,001$.

II°) Impact des polyphénols de *D.apetalum* sur un modèle murin d'athérosclérose

II,1°) Introduction

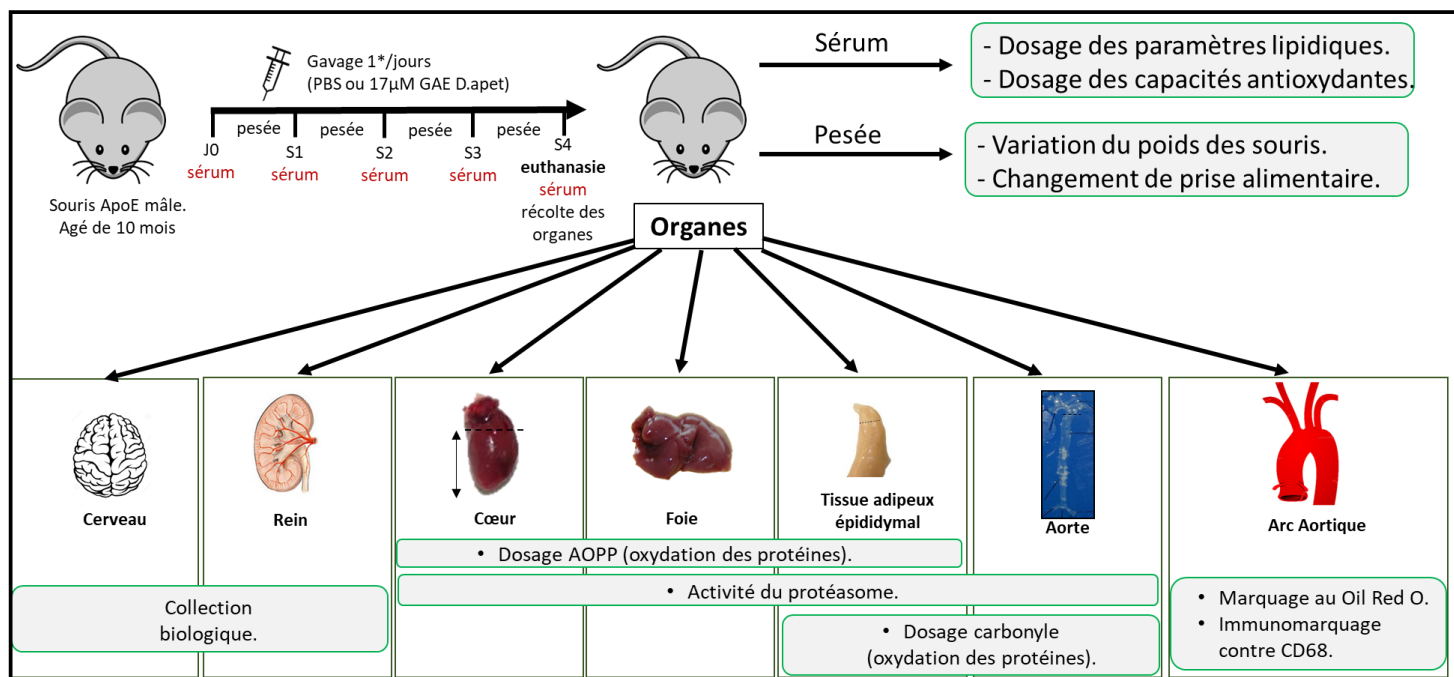
Le modèle murin (*Mus Musculus*) ne fait pas naturellement de plaque d'athérosclérose. Une explication possible pourrait être son taux naturellement bas de LDL-cholestérol³⁷⁷, dû à l'absence d'expression de la CETP³⁷⁸ (cholesteryl ester transfer protein), le cholestérol est donc naturellement transporté par les HDL. Pour disposer de modèle murin d'athérosclérose il faut travailler sur des modèles invalidés pour des gènes intervenant dans le métabolisme des LDL, dont les deux plus connus sont les LDL-R^{-/-} (augmentent la rémanence des lipoprotéines possédant l'ApoB en diminuant leur recapture) et les mutants ApoE^{-/-} (présents sur les IDL et chylomicron, nécessaires pour leur catabolisme au niveau hépatique. L'absence de l'ApoE augmente leur demi-vie plasmatique). Lorsque les souris ApoE KO sont nourries avec des régimes riches en graisses, elles commencent à développer des stries lipidiques à partir de 3 mois³⁷⁹ qui deviennent du fibro-athérome à 10 mois. De manière intéressante cependant ce modèle ne semble pas présenter les complications (hémorragie et rupture de plaques) retrouvées chez l'homme.

Quelques études^{380,381} semblent indiquer que certain flavonoïdes seraient capables de limiter la progression de la taille des plaques et la présence de marqueurs de l'inflammation dans ces modèles murins. Cependant, aucune étude n'existe testant l'impact des polyphénols dans des modèles de souris disposant déjà de plaques d'athérosclérose bien établies. Chez l'Homme, l'inflammation (entendue ici comme l'ensemble des mécanismes qui favorisent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires) est un facteur important de déstabilisation de la plaque, qui conduit aux complications cliniques. C'est pourquoi notre équipe a décidé de tester les capacités antioxydantes et anti-inflammatoires d'un ERP de *D.apetalum* sur un modèle murin de souris ApoE ko âgées (10 mois) qui présente déjà des plaques d'athéroscléroses au début du traitement. Notre hypothèse de travail principale était que *D.apetalum* pourrait diminuer les processus inflammatoires au niveau des plaques d'athérosclérose des gros vaisseaux, notamment le nombre de cellules inflammatoires.

Pour cela nous avons utilisé des souris C57B6 de fond génétique ApoE^{-/-} âgées de dix mois et nourries avec un régime hypercholestérolémique spécial (cf : matériel et méthode) qui favorise l'inflammation des plaques d'athérosclérose dans ce modèle. Ces souris ont été

gavées une fois par jour à la même heure sur une durée d'un mois avec 100µL de PBS (véhicule) ou 100µL d'ERP de *D.apetalum* déshydraté, puis réhydraté le jour même dans du PBS (17 µM GAE /dose). Chaque souris était pesée avant le gavage, et un prélèvement rétro-orbital de sang était effectué à jeun chaque semaine pour doser les paramètres lipidiques. A la fin du traitement, les souris étaient sacrifiées, les organes et le sang collectés

Le protocole complet est disponible dans la partie matériel et méthode. Un schéma illustratif des expériences est présenté en **Annexe 2**.



Annexe 2 : Résumé graphique des expérimentations *in vitro* avec les principaux paramètres observés.

Les souris ApoE KO mâles âgées de 10 mois ont été gavées 1 fois par jour avec une dose constante de *D.apetalum* réhydraté, ou le contrôle PBS. Leur poids était suivi tous les jours et des échantillons de sang ont été prélevés par voie rétro-orbitale, chaque semaine pour étudier les paramètres lipidiques. Après 1 mois de traitement, les souris ont été euthanasiées et les différents organes récoltés et stockés. Nous avons ensuite étudié différents marqueurs de l'oxydation dans plusieurs tissus puis étudié l'impact de *Doratoxylon apetalum* sur la présence de cellules CD68+ dans les plaques d'athérosclérose de l'arc aortique.

II,2°) Poids, prise alimentaire et paramètres lipidiques

Le contrôle du poids et de la prise alimentaire est important dans les expérimentations animales qui utilisent la technique de gavage car cela permet de s'assurer qu'aucune souris n'a souffert du gavage (douleur à l'alimentation qui entraîne refus de s'alimenter et perte de poids importante). De plus les informations récoltées ont permis de répondre à la question : est-ce que l'ERP de *D.apetalum* modifie le poids ou la prise alimentaire des souris traitées ?

Pour étudier les modifications de poids au cours de l'expérimentation nous avons tout d'abord calculé la moyenne de poids des cinq premiers (T0) et des cinq derniers (Tf) jours pour chaque souris. Après avoir fait la moyenne générale dans les groupes gavés avec du PBS (ctrl) ou avec *D.apetalum* (D.ap).

Les résultats obtenus (**figure 27 A**) montrent une absence de différence significative sur le poids entre les deux groupes, au début et à la fin du traitement. Si on regarde plus en détail le poids moyen des souris de chaque groupes par semaine (**Figure 27 B**), on observe au sein des deux groupes une légère diminution du poids dans les premières semaines, probablement imputable au stress du gavage lui-même. On n'observe aucune différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité. Le traitement avec l'ERP de *D.apetalum* n'influence donc pas le poids des souris comparé au groupe contrôle.

Pour évaluer si l'ERP de *D.apetalum* pouvait influencer la prise alimentaire, ce qui pourrait poser un biais dans nos autres analyses, nous avons calculé la prise alimentaire (en g de nourriture/ g de souris/ jours) chaque semaine (**Figure 27 C**). Pour ce faire, nous avons placé chaque souris dans une cage individuelle (à l'exception de trois souris contrôle, dont la prise alimentaire totale a été divisée en trois et rapportée au poids de chaque souris), puis nous avons rajouté chaque semaine une quantité de nourriture définie (en excès) et noté le poids restant à la fin de la semaine. On n'observe aucune différence significative entre nos groupes, mais on note une grande variabilité inter-individus.

Afin d'étudier les paramètres lipidiques, nous avons récupéré chaque semaine des échantillons de sang par voie rétro-orbitale sur des animaux à jeun (**Figure 27 D**). Le sérum était récupéré après coagulation et stocké à -20°C. Les plasmas des expériences n°1 et n°2 ont été dosés au même moment. On n'observe aucune différence significative dans

les paramètres lipidiques entre les deux groupes, à l'exception des triglycérides qui augmentent significativement à la fin du traitement dans le groupe traité avec l'ERP de *D. apetalum*.

En conclusion, le traitement n'affecte ni le poids, ni la prise alimentaire et semble peu modifier les paramètres lipidiques, sauf peut-être la concentration de triglycérides.

II,3°) Caractérisation des plaques d'athérosclérose chez les souris ApoE ko du groupe Contrôle et du groupe *D. apetalum*

Lors de l'euthanasie, l'aorte a été disséquée, débarrassée de son adventice puis ouverte longitudinalement avant d'être exposée "en face" sur une surface noire. Après acquisition photographique, la surface totale des plaques d'athérosclérose (blanchâtre) a été rapportée à la surface totale de l'artère calculée via le logiciel ImageJ (**voir figure 28**). On observe dans les deux groupes la présence de plaques d'athérosclérose chez toutes les souris comptant pour à peu près 25% de la surface totale de l'artère. Cependant aucune différence significative n'existe entre les deux groupes, ce qui était attendu car il a été décrit que les plaques d'athérosclérose se développent principalement entre 1 à 6 mois dans ce modèle murin.

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'ERP de *D. apetalum* sur les marqueurs de l'inflammation. Tout d'abord nous avons voulu rechercher les cytokines pro-inflammatoires circulantes (IL-6 ; TNF- α) par dosage ELISA, cependant les concentrations plasmatiques étaient inférieures à la sensibilité des kits disponibles et étant donné la quantité de sérum récolté, nous n'avons pas pu réaliser ces dosages. Nous avons alors réalisé des marquages immunofluorescents dirigés contre le CD68 (un marqueur classique des macrophages tissulaires et plus généralement des phagocytes) au niveau des sinus aortiques des souris des expériences 1 et 2 (**Figure 29**). Après analyse, on n'observe aucune différence significative entre les deux groupes, bien que la valeur d'intensité moyenne de fluorescence par plaque soit deux fois supérieure chez les souris contrôle. Le manque de significativité est peut être attribuable à quelques valeurs extrêmes, mais il faudrait augmenter le nombre d'échantillons pour vérifier cette hypothèse. Enfin nous avons aussi réalisé sur ces mêmes coupes des marquages au Oil Red O (**Figure 29**) afin de quantifier l'accumulation des lipides.

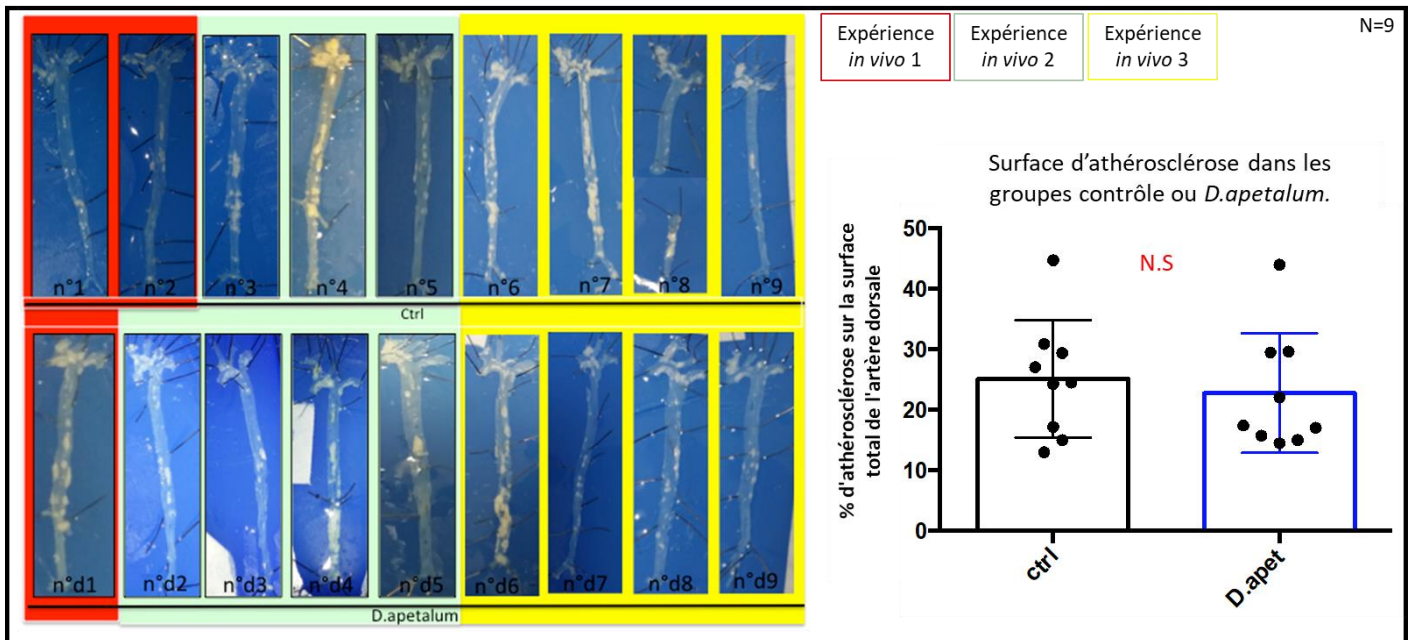


Figure 28 : Surface des plaques d'athérome dans les deux groupes

Les souris ApoE ko ont de nombreuses plaques d'athérome (zone blanchâtre) sur toute l'aorte, notamment au niveau de l'arc aortique. Aucune différence significative entre les deux groupes n'a été observée (T-test, non paramétrique).

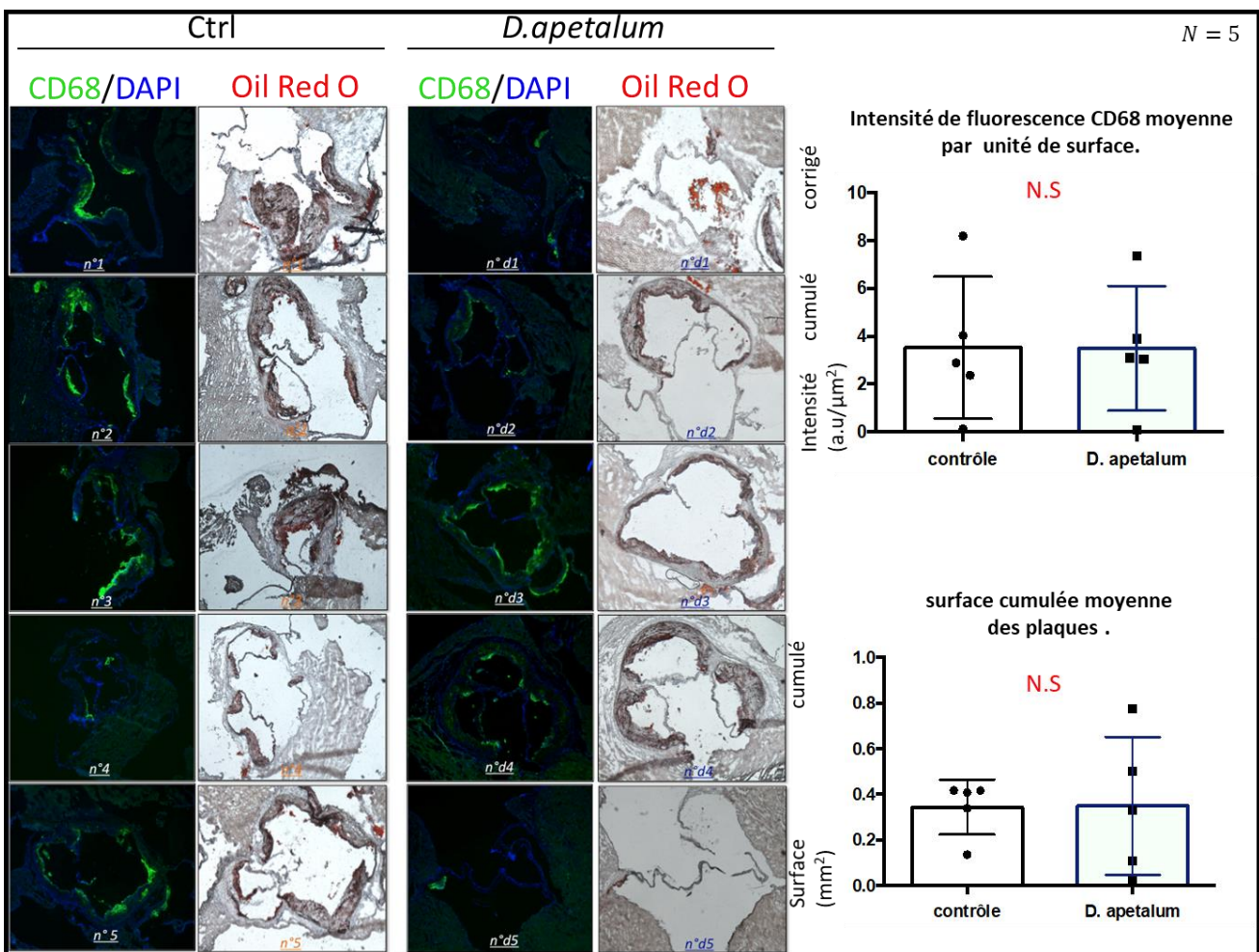


Figure 29 : Etude du statut inflammatoire des plaques d'athérosclérose au niveau du sinus aortique. Un immunomarquage anti-CD68 et une coloration des lipides Oil Red O, permettant de visualiser les plaques d'athérome ont été réalisés. Un test de student-T paramétrique a été utilisé pour les analyses statistiques.

Cependant une analyse de la surface occupée par les cœurs lipidiques est impossible car le contraste est trop faible pour éliminer efficacement le bruit de fond.

II,4°) Etudes des marqueurs d'oxydation chez les souris ApoE ko du groupe Contrôle et *D. apetalum*

Comme nous l'avons vu lors de l'introduction de cette thèse, les modifications oxydatives des lipoprotéines jouent un rôle prépondérant dans la progression de la pathologie. Cette oxydation peut avoir lieu dans la circulation ou au niveau de l'espace sub-endothélial. Le protéasome joue un rôle important dans le recyclage des protéines endommagées, il était donc pertinent d'étudier son activité, qui lorsqu'elle est élevée, peut être le reflet d'un stress du réticulum endoplasmique.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux capacités antioxydantes des sérums de souris récupérés lors de l'euthanasie (**Figure 30 A**). Pour comparer le pouvoir antioxydant des sérums nous avons utilisé le test KLR qui consiste à récupérer des érythrocytes de volontaires sains, de les purifier par lavage/centrifugation et à les mettre en présence d'une source de ROS (AAPH) qui va entraîner la lyse des globules rouges (suivi par la diminution de l'absorbance à 450 nm). La présence de plasma contenant des antioxydants (comme l'albumine) vont ralentir la lyse des globules rouges jusqu'à réaction totale des groupements réducteurs (plus le temps d'hémolyse est important et meilleure est la capacité antioxydante du plasma). Nous avons d'abord réalisé nos expériences sur le sérum des souris des expériences n°1 et n°2, car chronologiquement nous n'avions pas encore commencé les expériences sur les souris de la vague n°3. Il n'était pas possible de rassembler les données des trois expériences car nous n'avions plus suffisamment de sérum des anciennes souris et la lyse des globules rouges possède une cinétique qui varie sensiblement d'une expérience à l'autre.

Nous avons ensuite étudié des marqueurs de l'oxydation des protéines comme les carbonyles (**Figure 30 B**) (par western blot) dans l'aorte et dans le tissu adipeux épидидymal (d'autres sont encore à réaliser) ou encore les produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP) (**Figure 30 C.**) dans le tissu adipeux épидидymal, le foie et le cœur (leur étude dans les aortes est compliquée car cette technique demande beaucoup de

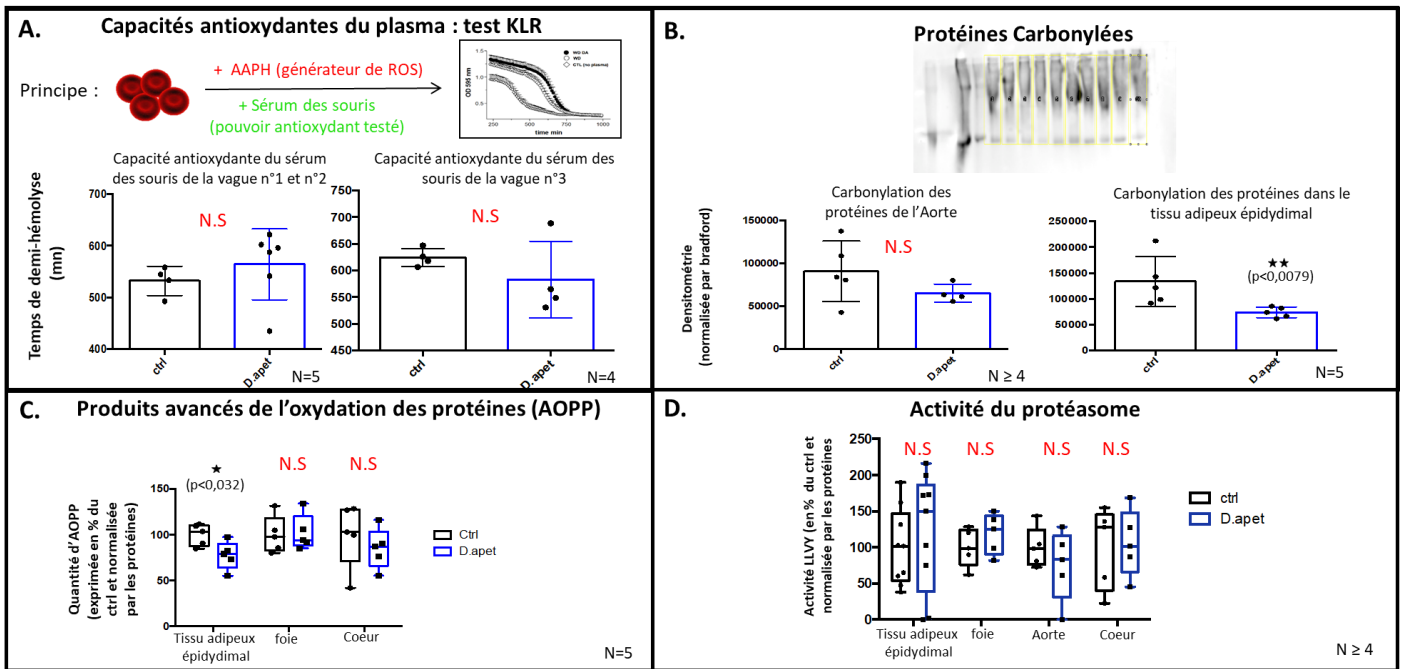


Figure 30 : Impact du traitement avec l'ERP de *D.apetalum* sur la capacité antioxydante du sérum et les marqueurs d'oxydation tissulaire

Nous avons dans un premier temps évalué la capacité des sérums (obtenus à partir du sang récupéré à l'euthanasie) à limiter la lyse des globules rouges induite par l'AAPHn une source de ROS (test KLR) (A). Nous avons ensuite étudié l'oxydation des protéines tissulaires via la carbonylation des protéines par western blot (B) et par dosage colorimétrique des AOPP par la chloramine T (C). Les protéines oxydées sont recyclées par le protéasome, nous avons donc quantifié l'activité LLVY du protéasome dans différents organes (D).

protéines). En ce qui concerne la carbonylation des protéines dans l'aorte, on n'observe aucune différence significative entre le groupe *D. apetalum* et le groupe contrôle. En revanche, on observe moitié moins de protéines carbonylées dans le tissu adipeux épidydimal du groupe traité avec l'ERP de *D.apetalum* par rapport au contrôle. Conformément à ces résultats, l'étude des AOPP révèle une diminution significative des AOPP dans le tissu adipeux épidydimal des souris gavées avec *D. apetalum*, par rapport à celles du groupe contrôle. Cependant on n'observe aucune différence significative de concentration des AOPP au niveau du cœur et du foie.

Enfin, nous avons mesuré l'activité LLVY du protéasome dans différents tissus, immédiatement après le broyage des organes. On n'observe aucune différence significative dans l'activité LLVY du protéasome dans le foie, le cœur, l'aorte ou le tissu adipeux épidydimal.

En conclusion, la variabilité inter-individuelle reste importante en ce qui concerne les marqueurs de l'oxydation. Cependant étant donné la faible quantité de polyphénol utilisée durant ces essais, et les résultats obtenus sur le tissu adipeux épidydimal, il est possible que l'ERP de *D. apetalum* soit capable de diminuer l'oxydation des protéines et par ce biais diminuer la progression de la pathologie. La diminution de l'oxydation au niveau du tissu adipeux semble sous-entendre que les responsables sont probablement relativement liposolubles, ce qui peut être une piste à explorer pour améliorer la biodisponibilité des antioxydants de *D.apetalum*.

Discussion / Conclusion.

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier l'impact de polyphénols extraits de plantes d'intérêt de la biodiversité réunionnaise, dans le contexte pathologique de l'athérosclérose.

Les expériences réalisées précédemment dans le laboratoire DÉTROIT³⁵⁶, ont mis en avant un potentiel anti-inflammatoire et antioxydant des extraits riches en polyphénols (ERP) de deux plantes de la biodiversité Réunionnaise : *A. borbonica* et *D. apetalum*. L'inflammation et le stress oxydant intracellulaire jouent un rôle important dans la progression des plaques d'athérosclérose. En effet, le recrutement de cellules inflammatoires (monocytes) pouvant se charger en lipides, participer à l'oxydation et produire des enzymes protéolytiques, va favoriser la progression du cœur nécroticolipidique et la déstabilisation de la chape fibreuse; de plus, l'augmentation du stress oxydant favorise l'oxydation des LDL qui peuvent être cytotoxiques pour la couche de cellules endothéliales.

Nous avons donc eu l'idée de tester des ERP de *D. apetalum*, *A. borbonica* d'abord, sur l'oxydation des LDL, dans un modèle de cellule endothéliale stressée par des LDL oxydées, puis dans un modèle animal de souris ApoE KO (modèle d'athérosclérose)

Les premiers résultats obtenus, concernant l'effet cytoprotecteur de nos ERP, montrent un gain de survie allant de 20 à 30% (dans l'ordre *D. apetalum* > *A. borbonica* > Curcumine). En ce qui concerne la sensibilité des HMEC aux polyphénols seuls, cette lignée de cellules endothéliales est capable de survivre à des doses d'ERP de *D. apetalum* et d'*A. borbonica* de 50µM GAE sans changement significatif de la viabilité. En revanche les HMEC meurent lorsque l'on utilise des doses de Curcumine de 50µM pendant 24h (données non présentées). Il semblerait néanmoins que ce seuil létal soit dépendant du type cellulaire, car des doses de 25µM semblent capables de tuer les hCMEC/D3 (lignée endothéliale cérébrale microvasculaire). De manière très intéressante, les HMEC soumises à des doses importantes de *D. apetalum* (25, 50 ou 100µM GAE) montrent une structure cellulaire altérée, avec une apparence plus fibrillaire. Il est possible que cela soit dû à la présence de quercétine, un polyphénol dont on retrouve dans la littérature qu'il est capable d'affecter le cytosquelette³⁹⁵ et de moduler de nombreux autres gènes³⁹⁶, de plus, on observe dans les cellules traitées, de nombreuses vésicules cytoplasmiques qui pourraient être des vésicules de lipophagie. Cette hypothèse trouve son origine dans les travaux récents de Xhu et al³⁹⁷ qui montre que la quercétine augmente la lipophagie dans un modèle d'hépatocyte, notamment par la voie mTOR. Ceci serait aussi en cohérence avec l'augmentation du flux d'autophagie que l'on observe avec l'ERP de *D. apetalum* seul, mais pas avec l'ERP de *A. borbonica* et en moindre mesure avec la curcumine.

Bien que nous ayons choisi de pré-incuber les cellules avec nos ERP pour leur laisser le temps d'activer d'éventuelles voies de signalisation, nous avons aussi testé de rajouter l'ERP de *D. apetalum* à des temps plus tardifs (après l'ajout des LDL oxydées). Nous avons été étonnés de constater que l'ajout de *D. apetalum*, même à des stades tardifs (20h après ajout des LDL oxydées) semble capable de protéger en partie les cellules de l'effet cytotoxique des LDLox. On observe une protection maximale lorsque l'on rajoute l'ERP entre -2 et 6h puis une protection plus modeste après 8h d'incubation avec les LDLox. Il faut ici contextualiser, ces expériences ont été réalisées avec des lots de LDL oxydées faiblement cytotoxiques (50% des cellules mortes au bout de 36-48h), il y avait donc peu de cellules apoptotique à 20h de traitement. J'ai effectué une électrophorèse des LDL en conditions non dénaturantes pour comparer le profil de migration de ces lots oxydés à La Réunion, par rapport à ceux de Toulouse et je me suis aperçu que les LDL oxydées à DÉTROIT migraient systématiquement plus que celles du laboratoire de Toulouse, ce qui témoigne d'une plus forte oxydation et un gain de charges négatives (données non présentées). De plus le dosage des TBARS dans les deux lots de LDL montre aussi une oxydation largement supérieure pour les LDL oxydées à DÉTROIT. Il est donc possible que le retard observé dans le déclenchement de l'apoptose des cellules puisse correspondre à une captation moins efficace de ces LDL très oxydées par les cellules endothéliales ; en effet, différents récepteurs sont mis en jeu (récepteurs aux LDL pour les LDL faiblement oxydées vs récepteur scavengers pour les LDL fortement modifiées).

Nous avons aussi cherché à explorer les capacités antioxydantes de nos ERP vis-à-vis de l'oxydation des LDL. Dans un premier temps nous avons comparé leurs capacités antioxydantes sur l'oxydation au cuivre des LDL et montré que nos ERP comme la curcumine pouvaient diminuer la formation de produits d'oxydation des lipides, comme les hydroperoxydes. Nous n'avons pas observé de différence importante entre les deux ERP, la raison principale est probablement que la méthode utilisée pour donner la « concentration » de nos ERP n'est pas une molarité mais correspond à la capacité reductrice totale de l'ERP, en équivalent réducteur de l'acide gallique. Pour cette raison, à même concentration GAE (*gallic acid equivalent*, ou équivalent acide gallique) on a le même pouvoir réducteur. Il est donc relativement normal que l'on observe le même pouvoir antioxydant dans un modèle acellulaire.

Puis nous avons testé les capacités antioxydantes sur l'oxydation de LDL natives mises en contact avec des cellules endothéliales. Dans ce modèle *in vitro* nous avons observé que, là encore, les deux ERP étaient capables de diminuer la quantité d'espèces réagissant avec l'acide thiobarbiturique (ou TBARS) qui permet le dosage différents produits d'oxydation des lipides (aldéhydes).

Enfin pour vérifier que les ERP pouvaient avoir un effet sur le stress oxydatif intracellulaire, nous avons rajouté des LDL oxydées (avec ou sans les ERP) sur des cellules endothéliales, puis mesuré

ce stress avec une sonde fluorescente. Les deux ERP et la curcumine ont été capables de protéger les cellules contre l'augmentation de ce stress oxydant intracellulaire. La diminution des ROS intracellulaires va impacter directement la viabilité cellulaire, notamment via une diminution du stress du réticulum.

On peut donc suspecter qu'une partie de l'effet cytoprotecteur observé avec nos ERP dans notre modèle, est du à leur capacité à diminuer l'augmentation des ROS intracellulaires induits par les LDL oxydées.

Il serait important d'étudier les protéines clés du stress du réticulum endoplasmique et les enzymes antioxydantes. Enfin, il serait intéressant de mesurer précisément la teneur en quercétine de *Doratoxylon apetalum* et de comparer son effet sur l'autophagie de l'ERP de *D.apetalum* à une même concentration de quercétine non conjuguée, et de métabolites physiologiques de la quercétine (formes glucuronidées, sulfatées ou méthylées).

Dans la deuxième moitié de cette étude, nous avons voulu tester l'impact de *D.apetalum* dans un modèle murin d'athérosclérose. Nous avons choisi des souris ApoE KO agée, avec l'hypothèse qu'une prise orale (gavage) d'ERP de *D. apetalum* pourrait améliorer le statut inflammatoire (quantité de macrophages) des plaques d'athérome déjà présentes chez ces souris au début du traitement.

Malheureusement, nous n'avons pas pu disposer d'un nombre suffisant de souris pour pouvoir conclure. Nous avons répété l'expérience trois fois, en fonction des souris disponibles. De plus, des problèmes d'approvisionnement en *D. apetalum* nous ont conduits à mélanger plusieurs récoltes pour avoir suffisamment de matière. Ces deux critères sont à prendre en compte comme des biais possible à l'expérimentation.

Comme l'ERP de *D. apetalum* est antioxydant et étant donné l'importance des taux de LDL-cholestérol dans la progression de l'athérosclérose, nous avons décidé d'analyser certains marqueurs d'oxydation et les paramètres lipidiques dans différents tissus (en plus de l'aorte) .

Les souris des deux groupes ne se différenciaient ni par leur poids, ni en ce qui concerne les paramètres lipidiques étudiés (LDL / HDL / triglycérides). Nous n'avons pas observé de différences significatives dans la capacité antioxydante du plasma mais les souris gavées avec l'ERP de *D. apetalum* avaient des taux plus faibles d'oxydation des protéines dans le tissu adipeux épидидymal (mais pas dans l'aorte, le foie ou le cœur). Les polyphénols ayant en général une faible biodisponibilité orale, il n'est pas étonnant de n'observer aucune différence plasmatique entre les deux groupes. La diminution des protéines oxydées tissulaires est plus intéressante, mais ici il semble que seul le tissu adipeux épидидymal (prélevé car il semblait y avoir des différences de poids importantes entre les deux groupes dans la première vague de souris, résultats qui se sont

avérés ne pas être significatifs avec la seconde vague) ait moins de protéines oxydées dans le groupe gavé à l'ERP de *D. apetalum*.

En ce qui concerne la présence de macrophages dans les plaques, le point important de l'étude, des coupes transversales ont été réalisées au microtome au niveau du sinus aortique des souris des deux groupes. Un immunomarquage dirigé contre CD68⁺, un marqueur de phagocytes (macrophages en particulier) a été réalisé et une tentative de quantification de ce marquage n'a pas révélé de différences significative de l'infiltrat phagocytaire entre les deux groupes. Il serait possible d'améliorer la technique, par exemple en doublant l'immunomarquage avec un marquage d'une protéine spécifique de la cellule musculaire lisse (comme l' α -smooth muscle actin ou la myosine par exemple). Pour la suite il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons pour l'expérience d'immunofluorescence.

En observant les paramètres d'oxydation, on peut formuler l'hypothèse que les polyphénols de l'ERP de *D. apetalum* sont peu biodisponibles. Il serait donc intéressant d'essayer d'autres techniques pour apporter les polyphénols au niveau des plaques. L'encapsulation des polyphénols, la fixation sur microparticules et l'injection intrapéritonéale restent des pistes intéressantes. Certains polyphénols³⁹⁸, sont capables de se lier au LDL et d'augmenter leur résistance à l'oxydation. Les LDL seraient donc un vecteur intéressant car elles s'accumulent dans les plaques.

Pour les perspectives de ce sujet, deux pistes sont envisageables : étudier plus en détail l'impact de l'ERP de *D. apetalum* sur la voie mTOR et le stress du réticulum dans des macrophages, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales ; étudier de nouveaux moyens de transport de l'ERP *in vivo*, si possible en évitant les voies d'administration les plus invasives (injections intrapéritonéale ou intraveineuses).

Il serait aussi intéressant d'étudier l'évolution de la pathologie dans ce même modèle, mais avec des souris plus jeunes, en ciblant l'athérogenèse plutôt que la réduction de l'inflammation d'une plaque déjà présente. Le choix de la méthode d'administration devrait tenir compte des propositions ci-dessus.

Durant ce travail de thèse j'ai caractérisé l'effet antioxydant, cytoprotecteur et anti-inflammatoire d'ERP de *D. apetalum* et *A. borbonica* dans un modèle de cellules endothéliales stressées avec des LDL oxydées. J'ai ensuite sélectionné l'ERP de *D. apetalum*, qui présentait les meilleurs effets antioxydants et cytoprotecteurs *in vitro*, puis j'ai testé ses effets sur la composition de la plaque d'athérome constituée dans un modèle de souris ApoE KO âgées. Je n'ai pas pu mettre en évidence de différence significative, mais cela est peut être due à la taille de l'échantillon, ou à la technique utilisé.

Je remercie une dernière fois toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser cette thèse et à me former, ainsi que tout ceux qui m'ont soutenu tout au long de ces travaux.

FIN

Bibliographie.

1. WHO. *Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015*. Geneva, World Health Organization; 2016. (2015).
2. Roth, G. A. *et al.* Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation* **132**, 1667–1678 (2015).
3. Mozaffarian, D. *et al.* *Heart disease and stroke statistics-2015 update : A report from the American Heart Association*. *Circulation* **131**, (2015).
4. Global Burden of Disease. Gbd Profile : France 2010. *IHME-Institute Heal. Metrics Eval.* **2010**, 1–4 (2010).
5. (Drees), S. publique F. *L'état de santé de la population en france. Rapport DREES* (2017).
6. Authors/Task Force Members *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. Heart J.* **29**, 2388–2442 (2008).
7. Badimon, L. & Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine* **276**, 618–632 (2014).
8. Hanke, H., Lenz, C. & Finking, G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. *Acta Chir. Belg.* **101**, 162–9 (2001).
9. Libby, P. History of Discovery : Inflammation in Atherosclerosis. *Arter. Thromb Vasc Biol.* **32**, 2045–2051 (2012).
10. Barr, D. P., Russ, E. M. & Eder, H. A. Protein-lipid relationships in human plasma: II. In atherosclerosis and related conditions. *Am. J. Med.* **11**, 480–493 (1951).
11. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 2804–8 (1973).
12. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. History of Discovery : The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb.* **29**, 431–438 (2010).
13. Altschul, R. & Hoffer, A. Effects of salts of nicotinic acid on serum cholesterol. *Br. Med. J.* **2**, 713–4 (1958).
14. Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of

- cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **29**, 1346–1348 (1976).
15. Wann, S. & Thomas, G. S. What can ancient mummies teach us about atherosclerosis? *Trends in Cardiovascular Medicine* **24**, 279–284 (2014).
 16. Gabet, Amélie ; Danchin, Nicolas; Olié, V. Infarctus du myocarde chez la femme : évolutions des taux d'hospitalisation et de mortalité, France, 2002-2013. (2015).
 17. Lang, T. & Ribet, C. Les maladies cardio-vasculaires à la réunion. *Obs. Régional La Santé* (2009). doi:10.1016/S1773-035X(10)70496-2
 18. DIABETE A La Réunion. *Obs. Régional La Santé La Réunion* **2008**, (2008).
 19. Favier, F. *et al.* Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Réunion Island, the REDIA Study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67**, 234–242 (2005).
 20. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **3**, 2011–2030 (2006).
 21. United Nations. World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. 46 (2017).
 22. Wagner, A. *et al.* État des lieux sur l' hypertension artérielle en France en 2007 : l' étude Mona Lisa. *BEH thématique 49-50* 483–486 (2008).
 23. Favier, F. *et al.* Prevalence of Type 2 diabetes and central adiposity in La Réunion Island, the REDIA Study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67**, 234–242 (2005).
 24. Maladie, C. nationale de l'Assurance. Hypertension artérielle et facteurs de risque associés: une nouvelle étude de l'Assurance maladie sur les évolutions entre 2000 et 2006. *L'Assurance Mal. Caiss. Natl.* 1–10 (2007).
 25. Edward A. LEW, F. A. P. H. . Insurance Mortality Investigations of Physical Impairments Insurance Mortality Investigations of Physical Impairments. (1950).
 26. Lewington, S. Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies (vol 360, pg 1903, 2002). *Lancet* **361**, 1060 (2003).
 27. Mitchell, G. F. *et al.* Hemodynamic correlates of blood pressure across the adult age spectrum: Noninvasive evaluation in the framingham heart study. *Circulation* **122**, 1379–1386 (2010).
 28. Vaitkevicius, P. V *et al.* Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation* **88**, 1456–62 (1993).

29. MacGregor, G. A. *et al.* Double-blind randomised crossover trial of moderate sodium restriction in essential hypertension. *Lancet* **1**, 351–355 (1982).
30. Choi, H. Y., Park, H. C. & Ha, S. K. Salt sensitivity and hypertension: A paradigm shift from kidney malfunction to vascular endothelial dysfunction. *Electrolyte and Blood Pressure* **13**, 7–16 (2015).
31. Higashi, Y., Kihara, Y. & Noma, K. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertens. Res.* **35**, 1039–1047 (2012).
32. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Frontiers in Physiology* **6**, (2015).
33. Wang, B. *et al.* Enhanced matrix metalloproteinases-2 activates aortic endothelial hypermeability, apoptosis and vascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **57**, 325–338 (2014).
34. Liu, X., Fan, Y. & Deng, X. Effect of the endothelial glycocalyx layer on arterial LDL transport under normal and high pressure. *J. Theor. Biol.* **283**, 71–81 (2011).
35. Belo, V. A., Guimarães, D. A. & Castro, M. M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *J. Vasc. Res.* **52**, 221–31 (2015).
36. Li, Q., Yon, J., Cai, H., Angeles, C. L. & Angeles, L. Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension. *J. Hypertens.* **33**, 1128–1136 (2016).
37. Liang, X. *et al.* Biomechanical factors in coronary vulnerable plaque risk of rupture: intravascular ultrasound-based patient-specific fluid–structure interaction studies. *Coron Artery Dis Wolters Kluwer Heal. Coron. Artery Dis.* **24**, 75–8775 (2013).
38. Ettehad, D. *et al.* Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **387**, 957–967 (2016).
39. Gofman, J. W. *et al.* The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Science (80-.)*. **111**, 166–171 (1950).
40. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Koch's postulates for cholesterol. *Cell* **71**, 187–188 (1992).
41. Navab, M. *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 831–842 (1996).
42. Austin, M. A. *et al.* Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *Jama* **260**, 1917–21 (1988).

43. Gardner, C. D., Fortmann, S. P. & Krauss, R. M. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* **276**, 875–81 (1996).
44. Taylan, E. & Tuncel, E. P. Distribution of LDL subgroups in patients with hyperlipidemia. *Turkish J. Med. Sci.* **46**, 374–380 (2016).
45. Zakiev, E. R. *et al.* Lipid composition of circulating multiple-modified low density lipoprotein. *Lipids Health Dis.* **15**, 134 (2016).
46. Steinberg, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J. Lipid Res.* **50**, S376–S381 (2009).
47. Piepoli, M. F. *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* **37**, 2315–2381 (2016).
48. Fu, J. *et al.* Western database of lipid variants (WDLV): A catalogue of genetic variants in monogenic dyslipidemias. *Can. J. Cardiol.* **29**, 934–939 (2013).
49. Panagiotakos, D. B. *et al.* Adherence to Mediterranean Diet Offers an Additive Protection Over the Use of Statin Therapy: Results from the ATTICA Study (2002-2012). *Curr. Vasc. Pharmacol.* **13**, 778–787 (2015).
50. Wang, Y. & Xu, D. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. *Lipids Health Dis.* **16**, 132 (2017).
51. Bays, H. E. *et al.* Obesity, adiposity, and dyslipidemia: A consensus statement from the National Lipid Association. *J. Clin. Lipidol.* **7**, 304–383 (2013).
52. Eschwège, E., Charles, M.-A. & Basdevant, A. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. *Etude ObEpi* 60 (2012).
53. Observatoire Regional de la Santé océan indien. Le diabète à la Réunion, rapport d'étude. (2015).
54. Després, J. P. *et al.* Regional Distribution of Body Fat, Plasma Lipoproteins, and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis* **10**, 497–511 (1990).
55. Jung, U. J. & Choi, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* **15**, 6184–6223 (2014).
56. Tchoukalova, Y. D. *et al.* Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18226–18231 (2010).
57. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between adipocyte size

- and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1023–1033 (2007).
58. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
59. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–30 (2003).
60. Clemente-Postigo, M. *et al.* Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. *PLoS One* **6**, (2011).
61. Klop, B., Wouter Jukema, J., Rabelink, T. J. & Castro Cabezas, M. A physician's guide for the management of hypertriglyceridemia: The etiology of hypertriglyceridemia determines treatment strategy. *Panminerva Medica* **54**, 91–103 (2012).
62. Capell, W. H., Zambon, A., Austin, M. A., Brunzell, J. D. & Hokanson, J. E. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1040–1046 (1996).
63. Hokanson, J. E., Krauss, R. M., Albers, J. J., Austin, M. A. & Brunzell, J. D. LDL Physical and Chemical Properties in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 452 LP-459 (1995).
64. Tribble, D. L., Holl, L. G., Wood, P. D. & Krauss, R. M. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* **93**, 189–199 (1992).
65. Björnheden, T., Babyi, A., Bondjers, G. & Wiklund, O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* **123**, 43–56 (1996).
66. Jaakkola, O. *et al.* Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* **4**, 379–385 (1993).
67. Sugimoto, K., Yasujima, M. & Yagihashi, S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 953–61 (2008).
68. Kandarakis, S. A., Piperi, C., Topouzis, F. & Papavassiliou, A. G. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* **42**, 85–102 (2014).
69. Ma, J. *et al.* The relationship between glycated hemoglobin and complexity of coronary artery lesions among older patients with diabetes mellitus. *PLoS One* **9**, (2014).
70. Cao, H., Chen, T. & Shi, Y. Glycation of human serum albumin in diabetes: impacts on the

- structure and function. *Curr Med Chem* **22**, 4–13 (2015).
71. Kalaria, T. R., Sirajwala, H. B. & Gohel, M. G. Serum fructosamine, serum glycated albumin and serum glycated β -lipoprotein in type 2 diabetes mellitus patients with and without microvascular complications. *J. Diabetes Metab. Disord.* **15**, 53 (2016).
 72. Sima, A. V. *et al.* Effect of irreversibly glycated LDL in human vascular smooth muscle cells: Lipid loading, oxidative and inflammatory stress. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2790–2802 (2010).
 73. Toma, L., Stancu, C. S., Botez, G. M., Sima, A. V. & Simionescu, M. Irreversibly glycated LDL induce oxidative and inflammatory state in human endothelial cells; added effect of high glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 877–882 (2009).
 74. Morita, S. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1–24 (2016).
 75. Nilsson, J., Wigren, M. & Shah, P. K. Vaccines against atherosclerosis. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 311–21 (2013).
 76. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes* **54**, 1615 LP-1625 (2005).
 77. Grundy, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Cleeman, J. I. & Kahn, R. A. Clinical Management of Metabolic Syndrome: Report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management. in *Circulation* **109**, 551–556 (2004).
 78. Isomaa, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**, 683–9 (2001).
 79. Kovacic, S. & Bakran, M. Genetic susceptibility to atherosclerosis. *Stroke Research and Treatment* (2012). doi:10.1155/2012/362941
 80. Whitfield, A. J., Barrett, P. H. R., Van Bockxmeer, F. M. & Burnett, J. R. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clinical Chemistry* **50**, 1725–1732 (2004).
 81. Wu, N.-Q. & Li, J.-J. PCSK9 gene mutations and low-density lipoprotein cholesterol. *Clin. Chim. Acta.* **431C**, 148–153 (2014).
 82. Bodzioch, M. *et al.* The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **22**, 347–51 (1999).
 83. Lee, M. H. *et al.* Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat. Genet.* **27**, 79–83 (2001).

84. Rios, J., Stein, E., Shendure, J., Hobbs, H. H. & Cohen, J. C. Identification by whole-genome resequencing of gene defect responsible for severe hypercholesterolemia. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4313–4318 (2010).
85. Yang, R. *et al.* A genome-wide linkage scan identifies multiple quantitative trait loci for HDL-cholesterol levels in families with premature CAD and MI. *J. Lipid Res.* **51**, 1442–1451 (2010).
86. Mehrabian, M. & Allayee, H. 5-Lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 447–457 (2003).
87. Zaina, S. Unraveling the DNA methylome of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 148–153 (2014).
88. Dunn, J., Simmons, R., Thabet, S. & Jo, H. The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **67**, 167–176 (2015).
89. Borghini, A., Cervelli, T., Galli, A. & Andreassi, M. G. DNA modifications in atherosclerosis: From the past to the future. *Atherosclerosis* **230**, 202–209 (2013).
90. Prescott, E., Scharling, H., Osler, M. & Schnohr, P. Importance of light smoking and inhalation habits on risk of myocardial infarction and all cause mortality. A 22 year follow up of 12 149 men and women in The Copenhagen City Heart Study. *J Epidemiol Community Heal.* **56**, 702–706 (2002).
91. FREEMAN, D. J. *et al.* Smoking and plasma lipoproteins in man: effects on low density lipoprotein cholesterol levels and high density lipoprotein subfraction distribution. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**, 630–640 (1993).
92. Freeman, D. J. *et al.* The effect of smoking on post-heparin lipoprotein and hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyl transferase activities in human plasma. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**, 584–591 (1998).
93. Tselepis, A. D. *et al.* Smoking induces lipoprotein-associated phospholipase A2 in cardiovascular disease free adults: The ATTICA Study. *Atherosclerosis* **206**, 303–308 (2009).
94. Gazi, I. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin. Chem.* **51**, 2264–2273 (2005).
95. Pittilo, R. M. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 219–30 (2000).
96. Undas, A. & Ariëns, R. A. S. Fibrin clot structure and function: A role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis,*

- Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, (2011).
97. Orth, S. R., Viedt, C. & Ritz, E. Adverse effects of smoking in the renal patient. *Tohoku J. Exp. Med.* **194**, 1–15 (2001).
 98. Oniki, K. *et al.* Interactive effects of smoking and glutathione S-transferase polymorphisms on the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Lett.* **220**, 143–149 (2013).
 99. Orth, S. R. Effects of smoking on systemic and intrarenal hemodynamics: influence on renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15 Suppl 1**, S58-63 (2004).
 100. Orth, S. R. & Hallan, S. I. Smoking: a risk factor for progression of chronic kidney disease and for cardiovascular morbidity and mortality in renal patients-absence of evidence or evidence of absence? *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 226–236 (2008).
 101. Shah, A. M. *et al.* Risk of All-Cause Mortality, Recurrent Myocardial Infarction, and Heart Failure Hospitalization Associated With Smoking Status Following Myocardial Infarction With Left Ventricular Dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **106**, 911–916 (2010).
 102. Goldberg, D. M., Soleas, G. J. & Levesque, M. Moderate alcohol consumption: The gentle face of janus. in *Clinical Biochemistry* **32**, 505–518 (1999).
 103. Cahill, P. A. & Redmond, E. M. Alcohol and cardiovascular disease-modulation of vascular cell function. *Nutrients* **4**, 297–318 (2012).
 104. Mukamal, K. J., Maclure, M., Muller, J. E. & Mittleman, M. A. Binge drinking and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* **112**, 3839–3845 (2005).
 105. Ruidavets, J.-B. *et al.* Patterns of alcohol consumption and ischaemic heart disease in culturally divergent countries: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *BMJ* **341**, c6077–c6077 (2010).
 106. Samitz, G., Egger, M. & Zwahlen, M. Domains of physical activity and all-cause mortality: Systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 1382–1400 (2011).
 107. Grøntved, A. & Hu, F. B. Television viewing and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a meta-analysis. *JAMA* **305**, 2448–2455 (2011).
 108. Held, C. *et al.* Physical activity levels, ownership of goods promoting sedentary behaviour and risk of myocardial infarction: Results of the INTERHEART study. *Eur. Heart J.* **33**, 452–466 (2012).
 109. Leischik, R. *et al.* Physical activity, cardiorespiratory fitness and carotid intima thickness:

- Sedentary occupation as risk factor for atherosclerosis and obesity. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **19**, 3157–3168 (2015).
110. Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Eur. J. Clin. Investig.* **47**, 600–611 (2017).
 111. Ellingsgaard, H. *et al.* Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13163–8 (2008).
 112. Ellingsgaard, H. *et al.* Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat. Med.* **17**, 1481–1489 (2011).
 113. King, D. *et al.* Effects of exercise and lack of exercise on insulin sensitivity and responsiveness. *J Appl Physiol* **64**, 1942–1946 (1988).
 114. Trevellin, E. *et al.* Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes* **63**, 2800–2811 (2014).
 115. Kelly, M. *et al.* AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: The effect of exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 449–454 (2004).
 116. Fisher, J. S., Gao, J., Han, D. H., Holloszy, J. O. & Nolte, L. A. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E18-23 (2002).
 117. DeVan, A. E. *et al.* Regular aerobic exercise protects against impaired fasting plasma glucose-associated vascular endothelial dysfunction with aging. *Clin. Sci. (Lond)*. **124**, 325–31 (2013).
 118. Durstine, J. L. *et al.* Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. *Sports Med.* **31**, 1033–1062 (2001).
 119. Cornelissen, V. A. & Smart, N. A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Heart Association* **2**, (2013).
 120. Kolmos, M., Krawczyk, R. S. & Kruuse, C. Effect of high-intensity training on endothelial function in patients with cardiovascular and cerebrovascular disease: A systematic review. *SAGE Open Med.* **4**, 205031211668225 (2016).
 121. Ribeiro, F. *et al.* Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a systematic review. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **92**, 1020–30 (2013).
 122. Zarins, C. K. *et al.* Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque

- localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ. Res.* **53**, 502–514 (1983).
123. Simmons, R. D., Kumar, S. & Jo, H. The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **591**, 111–131 (2016).
 124. Mansbach, C. M. & Gorelick, F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G645–G650 (2007).
 125. Cooper, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* **38**, 2173–2192 (1997).
 126. Diffenderfer, M. R. & Schaefer, E. J. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr. Opin. Lipidol.* **25**, 221–226 (2014).
 127. Ayyobi, A. F. *et al.* Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1289–1294 (2003).
 128. Berneis, K., Jeanneret, C., Muser, J., Felix, B. & Miserez, A. R. Low-density lipoprotein size and subclasses are markers of clinically apparent and non-apparent atherosclerosis in type 2 diabetes. *Metabolism.* **54**, 227–234 (2005).
 129. Nikolic, D. *et al.* Lipoprotein Subfractions in Metabolic Syndrome and Obesity: Clinical Significance and Therapeutic Approaches. *Nutrients* **5**, 928–948 (2013).
 130. Brunzell, J. D., Zambon, A. & Deeb, S. S. The effect of hepatic lipase on coronary artery disease in humans is influenced by the underlying lipoprotein phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1821**, 365–372 (2012).
 131. Escargueil-Blanc, I. *et al.* Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 331–339 (1997).
 132. Vindis, C. *et al.* Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 639–645 (2005).
 133. Yia-Herttuala, S. *et al.* Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* **84**, 1086–1095 (1989).
 134. Ohmura, H. *et al.* Lipid compositional differences of small, dense low-density lipoprotein

- particle influence its oxidative susceptibility: Possible implication of increased risk of coronary artery disease in subjects with phenotype B. *Metabolism*. **51**, 1081–1087 (2002).
135. Anber, V., Griffin, B. A., McConnell, M., Packard, C. J. & Shepherd, J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* **124**, 261–271 (1996).
 136. Srinivasan, S. R., Vijayagopal, P., Eberle, K., Radhakrishnamurthy, B. & Berenson, G. S. Low-density lipoprotein binding affinity of arterial wall proteoglycans: characteristics of a chondroitin sulfate proteoglycan subfraction. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1006**, 159–166 (1989).
 137. Younis, N. N. *et al.* Small dense LDL is more susceptible to glycation than more buoyant LDL in Type 2 diabetes. *Clin. Sci. (Lond)*. **124**, 343–9 (2013).
 138. Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B. & Dawber, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* **62**, 707–714 (1977).
 139. Kontush, A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* **103**, 341–349 (2014).
 140. Park, D. *et al.* Inhibition of intimal hyperplasia by local perivascular application of rapamycin and imatinib mesilate after carotid balloon injury. *J. Korean Surg. Soc.* **85**, 296–301 (2013).
 141. Subbotin, V. M. Excessive intimal hyperplasia in human coronary arteries before intimal lipid depositions is the initiation of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **21**, 1578–1595 (2016).
 142. Ho-Tin-Noé, B. *et al.* Early atheroma-derived agonists of peroxisome proliferator-activated receptor- γ trigger intramedial angiogenesis in a smooth muscle cell-dependent manner. *Circ. Res.* **109**, 1003–1014 (2011).
 143. Armstrong, S. M. *et al.* A novel assay uncovers an unexpected role for SR-BI in LDL transcytosis. *Cardiovasc. Res.* **108**, 268–277 (2015).
 144. Sun, S. *et al.* Caveolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 1336–1342 (2010).
 145. Cancel, L. M., Fitting, A. & Tarbell, J. M. In vitro study of LDL transport under pressurized (convective) conditions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H126-32 (2007).
 146. Cancel, L. M. & Tarbell, J. M. The role of apoptosis in LDL transport through cultured

- endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* **208**, 335–341 (2010).
147. Rosengren, B. I., Carlsson, O., Venturoli, D., Al Rayyes, O. & Rippe, B. Transvascular passage of macromolecules into the peritoneal cavity of normo- and hypothermic rats in vivo: Active or passive transport? *J. Vasc. Res.* **41**, 123–130 (2004).
 148. Essler, M. *et al.* Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* **274**, 30361–30364 (1999).
 149. Hurt-Camejo, E. *et al.* Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 569–83 (1992).
 150. Murphy, J. E. *et al.* Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2. *J. Cell Sci.* **121**, 2136–2147 (2008).
 151. Otsuka, F. *et al.* Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis* **241**, 772–782 (2015).
 152. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. & Farb, A. Pathology of the Thin-Cap Fibroatheroma: A Type of Vulnerable Plaque. *J Interv. Cardiol* **16**, 267–272 (2003).
 153. Mughal, M. M. *et al.* Symptomatic and asymptomatic carotid artery plaque. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **9**, 1315–1330 (2011).
 154. Budoff, M. J. *et al.* Long-Term Prognosis Associated With Coronary Calcification. Observations From a Registry of 25,253 Patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1860–1870 (2007).
 155. Wu, S. S., Lin, X., Yuan, L. Q. & Liao, E. Y. The role of epigenetics in arterial calcification. *BioMed Research International* **2015**, (2015).
 156. Duer, M. J. *et al.* Mineral surface in calcified plaque is like that of bone further evidence for regulated mineralization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 2030–2034 (2008).
 157. Rutsch, F., Nitschke, Y. & Terkeltaub, R. Genetics in arterial calcification: Pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circulation Research* **109**, 578–592 (2011).
 158. Delbosc, S. *et al.* Erythrocyte Efferocytosis by the Arterial Wall Promotes Oxidation in Early-Stage Atheroma in Humans. *Front. Cardiovasc. Med.* **4**, 1–15 (2017).
 159. Moreno, P. R. *et al.* Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic

- lesions of human aorta: Implications for plaque vulnerability. *Circulation* **110**, 2032–2038 (2004).
160. Kuwahara, F. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-1 /Vascular Endothelial Growth Factor Pathway for Adventitial Vasa Vasorum Formation in Hypertensive Rat Aorta. *Hypertension* **39**, 46–50 (2002).
161. Wilson, S. H. *et al.* Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation* **105**, 415–418 (2002).
162. Mulligan-Kehoe, M. J. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol Am. J. Physiol. -Heart Circ. Physiol. by guest July Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **298**, 295–305 (2010).
163. Sluimer, J. C. *et al.* Thin-Walled Microvessels in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Show Incomplete Endothelial Junctions. Relevance of Compromised Structural Integrity for Intraplaque Microvascular Leakage. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1517–1527 (2009).
164. Michel, J.-B. *et al.* From intraplaque haemorrhages to plaque vulnerability: biological consequences of intraplaque haemorrhages. *J. Cardiovasc. Med.* **13**, 628–634 (2012).
165. Kolb, S., Vranckx, R., Huisse, M.-G., Michel, J.-B. & Meilhac, O. The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells. *J. Pathol.* **212**, 249–259 (2007).
166. Kolodgie, F. D. *et al.* Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where does it come from? *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 500–7 (2007).
167. Davies, M. J., Woolf, N., Rowles, P. M. & Pepper, J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br. Heart J.* **60**, 459–64 (1988).
168. White, S. J., Newby, A. C. & Johnson, T. W. Endothelial erosion of plaques as a substrate for coronary thrombosis. *Thromb. Haemost.* **115**, 509–519 (2016).
169. Li, Z. Y., Howarth, S. P. S., Tang, T. & Gillard, J. H. How critical is fibrous cap thickness to carotid plaque stability? A flow-plaque interaction model. *Stroke* **37**, 1195–1199 (2006).
170. Zhou, J., Li, Y.-S. & Chien, S. Shear Stress-Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2191–2198 (2014).
doi:10.1161/ATVBAHA.114.303422
171. Pandolfi, A. & De Filippis, E. A. Chronic hyperglycemia and nitric oxide bioavailability play a pivotal role in pro-atherogenic vascular modifications. *Genes and Nutrition* **2**, 195–208 (2007).

172. Steinberg, H. O. *et al.* Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction: Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **97**, 2601–2610 (1996).
173. Kim, J. A., Montagnani, M., Chandrasekran, S. & Quon, M. J. Role of Lipotoxicity in Endothelial Dysfunction. *Heart Failure Clinics* **8**, 589–607 (2012).
174. Steyers, C. M. & Miller, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 11324–11349 (2014).
175. Rossi, M. *et al.* Impact of long-term exposure to cigarette smoking on skin microvascular function. *Microvasc. Res.* **93**, 46–51 (2014).
176. Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C. & Prada, G. I. Oxidized LDL and NO synthesis- Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **151**, 101–113 (2015).
177. Kuchan, M. J. & Frangos, J. A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **266**, C628-36 (1994).
178. Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. & Moncada, S. Modulation of platelet aggregation by an l-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 87–88 (1991).
179. Mooradian, D. L., Hutsell, T. C. & Keefer, L. K. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 674–678 (1995).
180. Bath, P. M. W. The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **45**, 53–58 (1993).
181. Jourd'heuil, D. *et al.* Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 28799–28805 (2001).
182. Souza, J. M., Peluffo, G. & Radi, R. Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 357–366 (2008).
183. Gupta, S., Sodhi, S. & Mahajan, V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 889 (2009).
184. Dickhout, J. G. *et al.* Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: Implications in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2623–2629 (2005).

185. POBER, J. S. & COTRAN, R. S. THE ROLE OF ENDOTHELIAL CELLS IN INFLAMMATION. *Transplantation* **50**, 537–544 (1990).
186. Kume, N., Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. A. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. in *Journal of Clinical Investigation* **90**, 1138–1144 (1992).
187. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 803–815 (2007).
188. Davies, M. J. *et al.* The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* **171**, 223–229 (1993).
189. Cybulsky, M. I. *et al.* A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **107**, 1255–1262 (2001).
190. Mo, M., Eskin, S. G. & Schilling, W. P. Flow-induced changes in Ca²⁺ signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am. J. Physiol.* **260**, H1698–H1707 (1991).
191. Korenaga, R. *et al.* Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 213–219 (1994).
192. Curry, F. E. & Adamson, R. H. Endothelial glycocalyx: Permeability barrier and mechanosensor. *Annals of Biomedical Engineering* **40**, 828–839 (2012).
193. Potter, D. R. & Damiano, E. R. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. *Circ. Res.* **102**, 770–776 (2008).
194. Ebong, E. E., MacAluso, F. P., Spray, D. C. & Tarbell, J. M. Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1908–1915 (2011).
195. Van Den Berg, B. M., Spaan, J. A. E. & Vink, H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **457**, 1199–1206 (2009).
196. Norata, G. D., Tonti, L., Roma, P. & Catapano, A. L. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **12**, 297–305 (2002).
197. Rangaswamy, S., Penn, M. S., Saidel, G. M. & Chisolm, G. M. Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo. *Circ. Res.* **80**, 37–44 (1997).

198. Rong, J. X. *et al.* Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1885–1894 (1998).
199. May, J. M. & Qu, Z.-C. Ascorbic acid prevents increased endothelial permeability caused by oxidized low density lipoprotein. *Free Radic. Res.* **44**, 1359–68 (2010).
200. Gardner, G., Banka, C. L., Roberts, K. a, Mullick, a E. & Rutledge, J. C. Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 854–61 (1999).
201. Krouwer, V. J. D., Hekking, L. H. P., Langelaar-makkinje, M., Regan-klapisz, E. & Post, J. A. Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. 1–10 (2012).
202. Ungvari, Z., Wolin, M. S. & Csizsar, A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? *Antioxid Redox Signal* **8**, 1121–1129 (2006).
203. Gerrity, R. G., Naito, H. K., Richardson, M. & Schwartz, C. J. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am. J. Pathol.* **95**, 775–92 (1979).
204. Gerrity, R. G. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am. J. Pathol.* **103**, 181–190 (1981).
205. Cookson, F. B. The origin of foam cells in atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.* **52**, 62–9 (1971).
206. Wolfbauer, G., Glick, J. M., Minor, L. K. & Rothblat, G. H. Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7760–7764 (1986).
207. Andreeva, E. R., Pugach, I. M. & Orekhov, A. N. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* **135**, 19–27 (1997).
208. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Do vascular smooth muscle cells differentiate to macrophages in atherosclerotic lesions? *Circulation Research* **115**, 605–606 (2014).
209. Murry, C. E., Gipaya, C. T., Bartosek, T., Benditt, E. P. & Schwartz, S. M. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **151**, 697–705 (1997).
210. J.A., D. So Much Cholesterol: The unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Current Opinion in Lipidology* **27**, 155–161 (2016).

211. Fukuchi, M. *et al.* Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries. *Lab. Invest.* **82**, 1437–1447 (2002).
212. Nakashima, Y., Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T. N. & Sueishi, K. Early human atherosclerosis: Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1159–1165 (2007).
213. Gomez, D. & Owens, G. K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* **95**, 156–164 (2012).
214. Holycross, B. J., Blank, R. S., Thompson, M. M., Peach, M. J. & Owens, G. K. Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation. *Circ. Res.* **71**, 1525–32 (1992).
215. Gong, Q. & Pitas, R. E. Synergistic effects of growth factors on the regulation of smooth muscle cell scavenger receptor activity. *J Biol Chem* **270**, 21672–21678 (1995).
216. Vengrenyuk, Y. *et al.* Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-Myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 535–546 (2015).
217. Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T. & Francis, G. A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation* **129**, 1551–1559 (2014).
218. Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* **21**, 628–637 (2015).
219. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* **26**, 1257–1275 (1977).
220. Linton, M. F. *et al.* *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis.* *Endotext* **111**, (2000).
221. Seo, J. W., Yang, E. J., Yoo, K. H. & Choi, I. H. Macrophage differentiation from monocytes is influenced by the lipid oxidation degree of low density lipoprotein. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
222. Hardwick, S. J. *et al.* Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J. Pathol.* **179**, 294–302 (1996).
223. Virmani, R. *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25**, 2054–2061 (2005).

224. Balla, G., Jacob, H. S., Eaton, J. W., Belcher, J. D. & Vercellotti, G. M. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arter. Thromb* **11**, 1700–1711 (1991).
225. Adam, P. J., Regan, C. P., Hautmann, M. B. & Owens, G. K. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor β control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22 α in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 37798–37806 (2000).
226. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
227. Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol. Rev.* **89**, 957–989 (2009).
228. Li, D. Y. *et al.* Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* **393**, 276–280 (1998).
229. Chesler, N. C., Ku, D. N. & Galis, Z. S. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am. J. Physiol.* **277**, H2002–H2009 (1999).
230. Rudic, R. D. *et al.* Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* **101**, 731–736 (1998).
231. Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G. & Galis, Z. S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest.* **98**, 2572–2579 (1996).
232. Kiley, P. J. & Storz, G. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biology* **2**, (2004).
233. Harman, D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* **10**, 773–781 (2009).
234. Miwa, S., Riyahi, K., Partridge, L. & Brand, M. D. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019**, 388–391 (2004).
235. Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. Taking a ‘good’ look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology* **21**, 569–576 (2011).
236. Lapointe, J. & Hekimi, S. Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mcl1 $^{+/-}$ mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 26217–26227 (2008).

237. Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G. & Gluud, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* **297**, 842–857 (2007).
238. Gomez-Cabrera, M. C. *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 142–149 (2008).
239. Rhee, S. G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**, 1882–1883 (2006).
240. Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189 (2004).
241. Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472 (2010).
242. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 18515–18517 (1997).
243. Chen, Y., Azad, M. B. & Gibson, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* **16**, 1040–1052 (2009).
244. Murphy, M. P. Mitochondrial Thiols in Antioxidant Protection and Redox Signaling: Distinct Roles for Glutathionylation and Other Thiol Modifications. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 476–495 (2012).
245. NATTO, C., KAWAMURA, M. & YAMAMOTO, Y. Lipid Peroxides as the Initiating Factor of Atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **676**, 27–45 (1993).
246. Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. & Anderson, R. G. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* **82**, 597–613 (1979).
247. Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E. & Zetter, B. R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* **99**, 2034–2040 (1984).
248. Glavind, J. & Hartmann, S. The occurrence of peroxidized lipids in atheromatous human aortas. *Experientia* **7**, 464 (1951).
249. Nishio, E., Arimura, S. & Watanabe, Y. Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 413–418 (1996).
250. Bachem, M. G. *et al.* Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins

- stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Clin Chem Lab Med* **37**, 319–326 (1999).
251. Björkerud, B. & Björkerud, S. Tables 1-4: Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 416–24 (1996).
 252. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Striegl, G. & Juergens, G. Biochemical structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 77–92 (1990).
 253. Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. & Camaré, C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie* **125**, 281–296 (2016).
 254. Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C. & Salvayre, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 6–20 (2008).
 255. Yancey, P. G. & Jerome, W. G. Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *J. Lipid Res.* **39**, 1349–1361 (1998).
 256. Salonen, J. T. *et al.* Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* **339**, 883–887 (1992).
 257. Calmarza, P., Trejo, J. M., Lapresta, C. & López, P. LDL Oxidation and Its Association With Carotid Artery Intima-Media Thickness and Other Cardiovascular Risk Factors in a Sample of Spanish General Population. *Angiology* **65**, 357–362 (2014).
 258. Ahmad, H. M., Sarhan, E. M. & Komber, U. Higher circulating levels of OxLDL % of LDL are associated with subclinical atherosclerosis in female patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* **34**, 617–623 (2014).
 259. Williams, K. J. & Tabas, I. The Response-to-Retention Hypothesis of Early Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 551–561 (1995).
 260. Ehsan Ismail, N. A., Alavi, M. Z. & Moore, S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **105**, 79–87 (1994).
 261. Stocker, R. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381–1478 (2004).
 262. Nègre-Salvayre, A., Pieraggia, M.-T., Mabile, L. & Salvayrea, R. Protective effect of 17 β -estradiol against the cytotoxicity of minimally oxidized LDL to cultured bovine aortic

- endothelial cells. *Atherosclerosis* **99**, (1993).
263. Chen, M., Masaki, T. & Sawamura, T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: Implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacology and Therapeutics* **95**, 89–100 (2002).
264. Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R. & Negre-Salvayre, A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J* **8**, 1075–1080 (1994).
265. de Winther, M. P., van Dijk, K. W., Havekes, L. M. & Hofker, M. H. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 290–297 (2000).
266. Piccolo, P. *et al.* SR-A and SREC-I Are Kupffer and Endothelial Cell Receptors for Helper-dependent Adenoviral Vectors. *Mol. Ther.* **21**, 767–774 (2013).
267. Endemann, G. *et al.* CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 11811–6 (1993).
268. Swerlick, R. a, Lee, K. H., Wick, T. M. & Lawley, T. J. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **148**, 78–83 (1992).
269. Kruth, H. S. *et al.* Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **280**, 2352–60 (2005).
270. Miller, Y. I., Choi, S. H., Fang, L. & Harkewicz, R. Toll-Like Receptor-4 and Lipoprotein Accumulation in Macrophages. *Trends in Cardiovascular Medicine* **19**, 227–232 (2009).
271. Dandapat, A., Hu, C., Sun, L. & Mehta, J. L. Small concentrations of OXLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2435–2442 (2007).
272. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1358–1375 (2007).
273. Sata, M. & Walsh, K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J. Biol. Chem.* **273**, 33103–33106 (1998).
274. Chen, J. *et al.* Role of Caspases in Ox-LDL-Induced Apoptotic Cascade in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Circ. Res.* **94**, 370–376 (2004).

275. Aoudjit, F. & Vuori, K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: A role for c-Flip and implications for anoikis. *J. Cell Biol.* **153**, 633–643 (2001).
276. Rizzuto, R. Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science (80-.)*. **280**, 1763–1766 (1998).
277. Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**, 3460–3470 (2013).
278. Xu, C., Bailly-Maitre, B. & Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* **115**, 2656–64 (2005).
279. Sanson, M. *et al.* Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: Prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ. Res.* **104**, 328–336 (2009).
280. Vieira, O. *et al.* Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J.* **14**, 532–42 (2000).
281. Lipoprotein, L. Autophagy and Apoptosis in the Response of Human Vascular Endothelial Cells to Oxidized. **215004**, 27–33 (2015).
282. Nègre-Salvayre, A. *et al.* Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radical Biology and Medicine* **111**, 127–139 (2017).
283. Lu, J., Mitra, S., Wang, X., Khaidakov, M. & Mehta, J. L. Oxidative Stress and Lectin-Like Ox-LDL-Receptor LOX-1 in Atherogenesis and Tumorigenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2301–2333 (2011).
284. Cominacini, L. *et al.* Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275**, 12633–12638 (2000).
285. Li, D. & Mehta, J. L. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation* **101**, 2889–95 (2000).
286. Miller, Y. I., Choi, S. H., Wiesner, P. & Bae, Y. S. The SYK side of TLR4: Signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *British Journal of Pharmacology* **167**, 990–999 (2012).
287. Laursen, J. B. *et al.* Endothelial regulation of vasomotion in ApoE-deficient mice - Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* **103**, 1282–1288 (2001).

288. Karagiannis, G. S., Weile, J., Bader, G. D. & Minta, J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. *BMC Cardiovasc. Disord.* **13**, 4 (2013).
289. Frostegård, J. *et al.* Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 904–8 (1990).
290. Gao, S. & Liu, J. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic Dis. Transl. Med.* **3**, 89–94 (2017).
291. Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L. & Debeaujon, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**, 29–36 (2007).
292. Jaldappagari, S., Balakrishnan, S., Hegde, A. H., Teradal, N. L. & Narayan, P. S. Interactions of Polyphenols with Plasma Proteins: Insights from Analytical Techniques. *Curr. Drug Metab.* **14**, 456–473 (2013).
293. Feinleib, M. Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **245**, 511 (1981).
294. Barth, W. *et al.* Coronary heart disease mortality, morbidity, and case fatality in five east and west German cities 1985-1989. Acute Myocardial Infarction Register Teams of Augsburg, Bremen, Chemnitz, Erfurt, and Zwickau. *J Clin Epidemiol* **49**, 1277–1284 (1996).
295. De Lorgeril, M. *et al.* Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovascular Research* **54**, 503–515 (2002).
296. Hooper, L. *et al.* Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 38–50 (2008).
297. Hollman, P. C. H. *et al.* The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established. *J. Nutr.* **141**, 989S–1009S (2011).
298. Lin, X. *et al.* Cocoa Flavanol Intake and Biomarkers for Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Nutr.* 1–9 (2016). doi:10.3945/jn.116.237644
299. Di Castelnuovo, A. *et al.* Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Arch. Intern. Med.* **166**, 2437–45 (2006).

300. Waddington, E., Puddey, I. B. & Croft, K. D. Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 54–61 (2004).
301. Zhang, Y. *et al.* Resveratrol Enhances Autophagic Flux and Promotes Ox-LDL Degradation in HUVECs via Upregulation of SIRT1. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
302. Ungvari, Z. *et al.* Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2417–H2424 (2007).
303. Hung, C. H., Chan, S. H., Chu, P. M. & Tsai, K. L. Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1905–1917 (2015).
304. Bhaskar, S., Sudhakaran, P. R. & Helen, A. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway. *Cell. Immunol.* **310**, 131–140 (2016).
305. Greyling, A. *et al.* The effect of black tea on blood pressure: A systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE* **9**, (2014).
306. Khalesi, S. *et al.* Green tea catechins and blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *European Journal of Nutrition* **53**, 1299–1311 (2014).
307. Bjelakovic, G., Nikolova, D. & Gluud, C. Antioxidant supplements to prevent mortality. *JAMA* **310**, 1178–9 (2013).
308. Biesalski, H. K., Grune, T., Tinz, J., Zollner, I. & Blumberg, J. B. Reexamination of a meta-analysis of the effect of antioxidant supplementation on mortality and health in randomized trials. *Nutrients* **2**, 929–949 (2010).
309. Myung, S.-K. *et al.* Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* **346**, f10 (2013).
310. Balentine, D. A. *et al.* Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *Am. J. Clin. Nutr.* **101**, 1113–1125 (2015).
311. Bohn, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr. Rev.* **72**, 429–452 (2014).
312. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B. & Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 1321–1342 (2010).

313. Ncube, B., Finnie, J. F. & Van Staden, J. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany* **82**, 11–20 (2012).
314. Bavaresco, L., Lucini, L., Busconi, M., Flamini, R. & de Rosso, M. Wine resveratrol: From the ground up. *Nutrients* **8**, (2016).
315. Crespy, V. *et al.* Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 618–621 (2002).
316. Hollman, P. C. H., De Vries, J. H. M., Van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. B. & Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276–1282 (1995).
317. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333 (2009).
318. Wolffram, S., Blöck, M. & Ader, P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J. Nutr.* **132**, 630–635 (2002).
319. Lesser, S., Cermak, R. & Wolffram, S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J. Nutr.* **134**, 1508–11 (2004).
320. Tuck, K. L., Freeman, M. P., Hayball, P. J., Stretch, G. L. & Stupans, I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J. Nutr.* **131**, 1993–1996 (2001).
321. Pérez-Jiménez, J. *et al.* Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**, 102–107 (2009).
322. Manach, C. *et al.* Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* **125**, 1911–1922 (1995).
323. González-Santiago, M., Fonollá, J. & Lopez-Huertas, E. Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacol. Res.* **61**, 364–370 (2010).
324. Klotz, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metabolism Reviews* **41**, 67–76 (2009).
325. Maubach, J. *et al.* Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and

- biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **784**, 137–144 (2003).
326. Shehzad, A., Qureshi, M., Anwar, M. N. & Lee, Y. S. Multifunctional Curcumin Mediate Multitherapeutic Effects. *Journal of Food Science* (2017). doi:10.1111/1750-3841.13793
327. Lee, H.-S. *et al.* Curcumin inhibits TNF α -induced lectin-like oxidised LDL receptor-1 (LOX-1) expression and suppresses the inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by an antioxidant mechanism. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **25**, 720–729 (2010).
328. Kim, K.-H. *et al.* Curcumin attenuates TNF- α -induced expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and proinflammatory cytokines in human endometriotic stromal cells. *Phytother. Res.* **26**, 1037–47 (2012).
329. Anand, P., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Rajasekharan, K. N. & Aggarwal, B. B. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: Role of Michael acceptors and Michael donors. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1901–1909 (2011).
330. Simon, A. *et al.* Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure–activity relationships. *Cancer Lett.* **129**, 111–116 (1998).
331. Jackson, S. J. T., Murphy, L. L., Venema, R. C., Singletary, K. W. & Young, A. J. Curcumin binds tubulin, induces mitotic catastrophe, and impedes normal endothelial cell proliferation. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 431–438 (2013).
332. Jeong, G. S. *et al.* Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression: ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. *Exp. Mol. Med.* **38**, 393–400 (2006).
333. Guo, N. *et al.* Curcumin attenuates rapamycin-induced cell injury of vascular endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **66**, 338–346 (2015).
334. Shi, J., Deng, H. & Zhang, M. Curcumin pretreatment protects against PM2.5-induced oxidized low-density lipoprotein-mediated oxidative stress and inflammation in human microvascular endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* **16**, 2588–2594 (2017).
335. Han, J. *et al.* Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage. *Autophagy* **8**, 812–825 (2012).
336. Wang, Y. J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1867–1876 (1997).

337. Wu, J. C. *et al.* Tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin, induced autophagic cell death through coordinative modulation of PI3K/Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in human leukemia HL-60 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 1646–1654 (2011).
338. Aggarwal, B. B., Deb, L. & Prasad, S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules* **20**, 185–205 (2015).
339. Shoba, G. *et al.* Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* **64**, 353–356 (1998).
340. Jäger, R. *et al.* Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutr. J.* **13**, 11 (2014).
341. Marimoutou, M. *et al.* Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismut. *J. Inflamm.* **12**, 10 (2015).
342. Le Sage, F., Meilhac, O. & Gonthier, M. P. Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Pharmacol. Res.* **119**, 303–312 (2017).
343. Cao, X. *et al.* 1,5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. *Brain Res.* **1347**, 142–148 (2010).
344. Xiao, H. B. *et al.* 1,5-dicaffeoylquinic acid protects primary neurons from amyloid β 1-42-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Chin. Med. J. (Engl.)* **124**, 2628–2635 (2011).
345. Zha, R. P., Xu, W., Wang, W. Y., Dong, L. & Wang, Y. P. Prevention of lipopolysaccharide-induced injury by 3,5-dicaffeoylquinic acid in endothelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**, 1143–1148 (2007).
346. Jung, H., Im, S., Song, D. & Bae, J. Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. **50**, 323–328 (2017).
347. Fuentes, E. & Palomo, I. Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vascular Pharmacology* **63**, 155–161 (2014).
348. Chen, A. Y. & Chen, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry* **138**, 2099–2107 (2013).
349. Xiao, H. B., Lu, X. Y., Liu, Z. K. & Luo, Z. F. Kaempferol inhibits the production of ROS to

- modulate OPN- α v β 3 integrin pathway in HUVECs. *J. Physiol. Biochem.* **72**, 303–313 (2016).
350. Che, J. *et al.* Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of autophagy via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in human endothelial cells. *Cardiovasc. Pathol.* **31**, 57–62 (2017).
351. Zhang, L. *et al.* The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food Funct.* **7**, 1273–1281 (2016).
352. Li, X. *et al.* PIMT Prevents the Apoptosis of Endothelial Cells in Response to Glycated Low Density Lipoproteins and Protective Effects of Grape Seed Procyanidin B2. *PLoS One* **8**, (2013).
353. Yang, H. *et al.* Procyanidin B2 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **92**, 599–606 (2014).
354. Byun, M.-W. Effect of Procyanidin C1 on Nitric Oxide Production and Hyperpolarization Through Ca²⁺-Dependent Pathway in Endothelial Cells. *J. Med. Food* **15**, 1032–1037 (2012).
355. Kong, C.-S., Jeong, C.-H., Choi, J.-S., Kim, K.-J. & Jeong, J.-W. Antiangiogenic Effects of P-Coumaric Acid in Human Endothelial Cells. *Phytother. Res.* **199**, 317–323 (2012).
356. Martí-Carvajal, A. J., Solà, I. & Lathyris, D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane database Syst. Rev.* **1**, CD006612 (2015).
357. Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M. & Zappia, V. Olive oil phenolic compounds inhibit homocysteine-induced endothelial cell adhesion regardless of their different antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3478–3482 (2009).
358. Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G. & Villarreal, F. (-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **300**, C880–C887 (2011).
359. Moreno-Ulloa, A. *et al.* The effects of (-)-epicatechin on endothelial cells involve the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *Pharmacol. Res.* **100**, 309–320 (2015).
360. Brito, A. F. *et al.* Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? *Curr. Med. Chem.* **22**, 3025–3039 (2015).
361. Men, K. *et al.* Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **14**, 826–832 (2014).
362. Dajas, F. *et al.* Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochem. Int.* **89**, 140–

- 148 (2015).
363. Tribolo, S. *et al.* Human metabolic transformation of quercetin blocks its capacity to decrease endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and endothelin-1 secretion by human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8589–8596 (2013).
364. Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A. & Aggarwal, B. B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Molecular Pharmaceutics* **4**, 807–818 (2007).
365. Bhaskar, S., Shalini, V. & Helen, A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway. *Immunobiology* **216**, 367–373 (2011).
366. Zhu, Y. *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: From transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* (2015). doi:10.1111/accel.12344
367. Yang, H. H. *et al.* Quercetin-3-O- β -D-glucuronide isolated from *Polygonum aviculare* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Arch. Pharm. Res.* **37**, 1219–1233 (2014).
368. Cui, X., Luo, Y., Li, C., Li, Y. & Wang, Z. Changes of intracellular Ca²⁺ in quercetin-induced autophagy progression. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **47**, 908–914 (2015).
369. Liu, L., Gao, C., Yao, P. & Gong, Z. Quercetin alleviates high-fat diet-induced oxidized low-density lipoprotein accumulation in the liver: Implication for autophagy regulation. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
370. Vindis, C. *et al.* Desensitization of platelet-derived growth factor receptor- β by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: Prevention by aldehyde scavengers. *Circ. Res.* **98**, 785–792 (2006).
371. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. & Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202**, 384–389 (1992).
372. Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S. & Wolff, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26**, 853–856 (1991).
373. Yagi, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* **108**, 101–106 (1998).
374. Liu, S., Pan, S., Tan, J., Zhao, W. & Liu, F. Oxytocin inhibits ox-LDL-induced adhesion of monocytic THP-1 cells to human brain microvascular endothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **337**, 104–110 (2017).

375. Jeng, J. R., Chang, C. H., Shih-Ming, S. & Hui-Chong, C. Oxidized low-density lipoprotein enhances monocyte-endothelial cell binding against shear-stress-induced detachment. *BBA - Mol. Cell Res.* **1178**, 221–227 (1993).
376. Cominacini, L. *et al.* Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 117–127 (1997).
377. Gordon, S. M. *et al.* A comparison of the mouse and human lipoproteome: Suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins. *J. Proteome Res.* **14**, 2686–2695 (2015).
378. Hogarth, C. A., Roy, A. & Ebert, D. L. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **135**, 219–229 (2003).
379. Meir, K. S. & Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: A decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 1006–1014 (2004).
380. Verschuren, L. *et al.* A Dietary Mixture Containing Fish Oil, Resveratrol, Lycopene, Catechins, and Vitamins E and C Reduces Atherosclerosis in Transgenic Mice. *J. Nutr.* **141**, 863–869 (2011).
381. Loke, W. M. *et al.* Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 749–757 (2010).

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Mr Bonneville jonathan en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 25/06/2018

Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.