



**HAL**  
open science

# Effet des composés phénoliques sur le vieillissement cardiaque et rénal : étude expérimentale chez le rat

Stéphanie Chacar

► **To cite this version:**

Stéphanie Chacar. Effet des composés phénoliques sur le vieillissement cardiaque et rénal : étude expérimentale chez le rat. Biologie cellulaire. Université de Poitiers; Université Saint-Joseph (Beyrouth), 2018. Français. NNT : 2018POIT2275 . tel-02076999

**HAL Id: tel-02076999**

**<https://theses.hal.science/tel-02076999>**

Submitted on 22 Mar 2019

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

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

**THÈSE DE DOCTORAT DE**  
**L'UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH**  
**ET**  
**L'UNIVERSITÉ DE POITIERS**

Secteur de recherche

**Sciences de la vie - Physiologie et Physiopathologie (Ecole Doctorale Sciences et Santé, USJ)**

**Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie (Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé, UP)**

Présentée par :

**Stéphanie CHACAR**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH ET**  
**L'UNIVERSITÉ DE POITIERS**

Sujet de la thèse :

**Effet des composés phénoliques sur le vieillissement cardiaque et rénal : étude expérimentale chez le rat**

Soutenue le 6 juillet 2018

devant la Commission d'Examen

**JURY**

Pr. Nicolas Louka	Président
Dr. Flavien Charpentier	Rapporteur
Pr. Ramez Chahine	Rapporteur
Pr. Victor Jebara	Examineur
Pr. Patrick Bois	Examineur
Pr. Nassim Fares	Directeur de thèse
Pr. Richard Maroun	Directeur de thèse
Pr. Jean-François Faivre	Directeur de thèse

## Remerciements

Je n'aurai jamais pu finir cette thèse sans l'aide et le support de nombreuses personnes auxquelles je dois un remerciement qui ne suffira pas seul pour exprimer ma gratitude.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Doyen de la faculté des Sciences, Professeur Richard Maroun. Je vous remercie pour la grande opportunité que vous m'avez offerte. Merci pour vos conseils et pour le temps que vous m'avez consacré tout au long de cette période. Je vous remercie de m'avoir suscité à valoriser mes travaux. Merci pour votre participation dans la réalisation du manuscrit de cette thèse et des publications.

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Professeur Nassim Farès, pour la confiance que vous m'avez témoignée. J'ai énormément appris à vos côtés, merci pour votre bienveillance, vos conseils inestimables, vous avez dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de vos compétences scientifiques et votre passion de la physiologie. Merci pour votre participation dans la réalisation du manuscrit de cette thèse et des publications.

Le remerciement suivant revient à mon directeur de thèse français, Professeur Jean-François Faivre. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. Merci pour les accueils poitevins chaleureux. Vous étiez vraiment une personne attentionnée au niveau personnel et professionnel tout le long de mes séjours. Merci pour vos encouragements, votre support, votre patience et l'esprit de challenge qui m'a poussé à surmonter la difficulté de quelques manip ou situations face auxquelles je me sentais impuissante. Merci pour m'avoir formé au patch-clamp. Je vous remercie également pour votre participation dans la réalisation du manuscrit de cette thèse et des publications.

Mes remerciements aux Dr. Flavien Charpentier, Pr. Ramez Chahine, Pr. Victor Gebara, Pr. Patrick Bois et Pr. Nicolas Louka qui m'ont fait l'honneur de juger, examiner ce travail et faire partie du jury.

Je remercie le Pr. Roland Tomb, Doyen de la faculté de médecine, d'avoir accepté de réaliser ma thèse au sein du laboratoire de physiologie et de physiopathologie.

Je remercie également le conseil de recherche de l'USJ et le campus France qui m'ont soutenu financièrement durant cette thèse.

Docteur Youakim Saliba, je vous remercie vivement pour votre aide précieuse et vos conseils inestimables. Votre esprit de synthèse et votre érudition restent pour moi un exemple à suivre. Pendant les baisses de moral, vous avez toujours été présent, j'apprécie vraiment votre soutien.

Grâce à cette thèse, j'ai eu la chance d'avoir deux amies de cœur Joelle Et Sarah. Joelle Hajal, dès mon premier jour au laboratoire LRPP, ton sourire et ton accueil chaleureux m'ont soulagé. Avant même de bâtir profondément notre amitié, tu as proposé ton aide surtout lors de mon premier séjour en France avec beaucoup d'enthousiasme, tu as toujours été à mes côtés, je

ne pourrai jamais te remercier suffisamment. Sarah Rouhana, je te remercie également pour ton aide précieuse. Merci pour ton amitié et pour ton support. Tous les excellents moments que nous avons passé ensemble seront de bons souvenirs inoubliables pour moi. Je vous souhaite toutes les deux tout le meilleur...

Je suis très reconnaissante à tous les membres du laboratoire STIM surtout à Pr. Frederic Becq, et plus particulièrement à l'équipe TIRC et son directeur Pr. Patrick Bois. La « petite libanaise » vous remercie pour avoir accepté qu'elle réalise sa thèse en cotutelle au sein de votre équipe, vous avez montré une grande sympathie à mon égard. Je remercie Dr. Aurélien Chatelier, Dr. Jocelyn Bescond, Dr. Christian Cognard, Dr. Stéphane Sébile et Dr. Nathalie Delpech. Christauphe Magaud merci pour votre disponibilité au quotidien et pour votre support technique à tout moment et Claudine Descombes je vous remercie pour votre aide précieuse. Merci au personnel technique Mr. James Habrioux et aux personnels administratifs Mesdames Carole Desfontaines et Christelle Morillon qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse. Oualid, Khadidja, Amandine, Jodie, Chloé, Charles-Albert, Linette, Arnaud, Lionel et Sandra vous avez tous été adorables avec moi, merci pour les beaux moments partagés ensemble.

A la faculté des Sciences de l'USJ, je remercie Dr. André Khoury qui m'a toujours encouragé au cours de mon master et qui a tellement cru en moi. Je remercie Dr. Charbel Afif pour ses conseils et son aide précieuse. Madame Juliana Lahoud, Madame Nayla Nasr et Mr. Georges Rai merci pour vos amicaux accueils, jamais les procédures administratives étaient si faciles pour moi, un grand merci.

Aucune phrase ne pourrait remercier suffisamment ceux qui m'ont tout donné... Ceux à qui toute ma vie ne suffirait pas pour leur rendre une part de leur amour. Merci mes très chers parents, Philippe et Marie. Philippe merci pour ton support financier et surtout moral et émotionnel, merci pour nos discussions infinies à propos de la thèse, tu as toujours été au courant de tout, le suivi de mes manips, les présentations, les articles... merci pour tes encouragements, tu as toujours été là pour me soulager... Rien ne compte dans ma vie que ta fierté en moi... Marie, merci parce que tu as toujours été avec moi durant mes séjours poitevins pour m'assurer un environnement optimal, merci pour ta patience, j'ai de la chance d'avoir une mère aussi dévouée que toi... Je remercie mes sœurs, Cynthia et Nathalie, il n'y aura jamais de mots qui suffiront à vous dire combien je vous suis reconnaissante. Mon neveu : Ryan et mes nièces : Yasmina et Sasha, vous êtes la source de ma joie.

Je remercie du fond du cœur Randa et Fawzi Haber également pour leurs encouragements et leur soutien. Enfin, Georges Haber, mon très cher fiancé et bientôt mon mari, tu as toujours été à mes côtés à courte ou longue distance. C'est ton soutien indéfectible, tes encouragements, ton amour et ta patience qui m'ont poussé à aller plus loin. Merci pour ta tolérance face à mes sautes d'humeurs, merci pour les nuits que tu as passées près de moi pour me soulager et m'encourager à écrire les articles et le manuscrit. Ces 2 derniers mois tu m'a prouvé plus que jamais que quelle que soit la difficulté que je vais confronter durant ma vie, tu es toujours là pour moi. Je t'aime.

## Résumé

Le vieillissement est un processus physiologique au cours duquel l'ensemble de l'organisme voit son fonctionnement modifié. Il s'agit d'un remodelage génotypique et phénotypique, en lien avec le stress oxydatif. Les molécules antioxydantes comme les composés phénoliques (CP) ont pris une place importante dans la diète humaine, à titre de compléments alimentaires et/ou à titre thérapeutique. Toutefois, les conséquences d'un usage à long terme de ces molécules visant à reverser les effets du vieillissement sur les fonctions organiques, restent encore mal élucidées. Dans ce contexte, et compte tenu de notre intérêt pour le cœur, le rein et le microbiote intestinal, l'objectif de cette thèse est d'évaluer, sur de jeunes rats mâles, les effets des CP administrés à différentes concentrations, pendant quatorze mois. Les groupes traités par les CP ont montré une préservation, avec l'âge, de la performance cardiaque par rapport aux témoins non traités. De plus, les myocardiocytes de rats âgés traités ont présenté de moindres signes d'inflammation, de fibrose et d'apoptose que les témoins. Ces modifications sont soutenues par un remodelage du niveau d'expression protéique des marqueurs de l'hypertrophie et du stress oxydatif, et des résultats préliminaires suggèrent une activation du courant potassique KATP en présence des CP sur les myofibroblastes. Le tissu rénal conserve son architecture normale avec l'âge chez tous les groupes. Enfin, les métabolites issus des CP ont montré une modulation sélective du microbiote intestinal vers un phénotype sain. Nos travaux montrent dans un modèle murin qu'une consommation régulière de CP permet de préserver le cœur, les reins et le microbiote du remodelage lié au vieillissement.

**Mots clés : composés phénoliques, vieillissement, cœur, rein, microbiote intestinal**

**Abstract**

Aging is a physiological process in which the entire body sees its normal functional capacities modified. It is associated with a genotypic and phenotypic remodeling, related to oxidative stress. Antioxidant molecules such as phenolic compounds (PC), have taken an important place in the human diet, as food supplements and/or as therapeutics. However, the consequences of long-term use of these molecules to reverse the effects of aging on organic functions, remain poorly understood. In this context, and considering our interest for the heart, the kidney and the intestinal microbiota, the aim of this thesis is to evaluate, in young male rats, the effects of PC administered at different concentrations for a period of fourteen months. PC treated groups showed a dose-dependent preservation of cardiac morphology and performance compared to control untreated ones. Additionally, myocardia from treated aged rats exhibited less inflammation, fibrosis and cardiomyocyte apoptosis than controls. These modifications were supported by a remodeling of the proteins level expression of the markers of hypertrophy and oxidative stress, and preliminary data suggest a concomitant activation of potassium current KATP on myofibroblasts in the presence of PC. Renal tissues retained their normal architecture with age in all groups. Finally, derived-metabolites from PC showed a selective modulation of intestinal microbiota towards a healthy phenotype. Our work shows that regular consumption of PC may preserve the heart, kidneys and microbiota of age-related remodeling.

**Keywords: phenolic compounds, aging, heart, kidney, intestinal microbiota**

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. ETAT DE L'ART</b> .....	<b>3</b>
<b>1 LE VIEILLISSEMENT</b> .....	<b>3</b>
<b>2 PHYSIOLOGIE DU CŒUR</b> .....	<b>4</b>
2.1 LES CELLULES CARDIAQUES .....	4
2.1.1 <i>Les cellules myocytaires</i> .....	4
a. <i>Les cardiomyocytes</i> .....	4
b. <i>Les cellules nodales</i> .....	4
2.1.2 <i>Les cellules non-myocytaires</i> .....	5
a. <i>Les cellules endothéliales</i> .....	5
b. <i>Les cellules musculaires lisses</i> .....	5
c. <i>Les fibroblastes cardiaques (FCs)</i> .....	6
2.2 L'AUTOMATISME .....	7
2.3 L'EXCITABILITE .....	8
2.4 CONTRACTILITE ET COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION (EC) .....	9
2.5 PHENOMENES MECANIQUES .....	11
2.5.1 <i>Les phases du cycle cardiaque</i> .....	11
2.5.1.1 Remplissage ventriculaire .....	11
2.5.1.2 Systole ventriculaire .....	11
2.5.1.3 Relaxation isovolumétrique : protodiastole .....	11
2.6 DEBIT CARDIAQUE .....	12
2.6.1 <i>La précharge</i> .....	13
2.6.2 <i>La postcharge</i> .....	14
<b>3 VIEILLISSEMENT CARDIAQUE</b> .....	<b>15</b>
3.1 CHANGEMENTS STRUCTURELS .....	15
3.1.1 <i>Remodelage du ventricule gauche (VG)</i> .....	15
3.1.1.1 L'hypertrophie .....	17
3.1.1.2 L'inflammation .....	24
3.1.1.3 La fibrose .....	25
3.1.2 <i>Changements valvulaires</i> .....	26
3.1.3 <i>Système de conduction</i> .....	26
3.2 CHANGEMENTS FONCTIONNELS .....	26
3.2.1 <i>Fonction systolique</i> .....	26
3.2.2 <i>Fonction diastolique</i> .....	27
3.2.3 <i>Couplage excitation-contraction (EC)</i> .....	27
3.3 LES STRATEGIES INTERVENTIONNELLES "ANTI-AGE" POUR LE VIEILLISSEMENT CARDIAQUE .....	29
3.3.1 <i>La restriction calorique</i> .....	29
3.3.2 <i>Recours aux antioxydants</i> .....	29
<b>4 LES COMPOSES PHENOLIQUES (CP)</b> .....	<b>30</b>
4.1 GENERALITES .....	30
4.2 CLASSIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES .....	31
4.2.1 <i>Les composés non-flavonoïdes</i> .....	31

4.2.1.1	Les acides phénoliques.....	32
4.2.1.2	Les stilbènes.....	33
4.2.2	<i>Les composés flavonoïdes</i> .....	33
4.2.2.1	Les anthocyanes.....	33
4.2.2.2	Les flavanols ou les flavan-3-ol.....	34
4.2.2.3	Les flavonols, flavones, flavanones et isoflavones.....	35
4.3	LES COMPOSES PHENOLIQUES : DES ANTIOXYDANTS EXOGENES.....	36
	<i>Des éléments de lutte contre l'oxydation</i> .....	36
4.4	METABOLISME DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	38
4.5	LE MARC DE RAISIN.....	40
4.5.1	<i>Composition</i> .....	41
4.5.2	<i>Applications</i> .....	41
4.5.3	<i>Extraction des composés phénoliques à partir du marc de raisin</i> .....	42
<b>5</b>	<b>COMPOSES PHENOLIQUES ET SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE.....</b>	<b>43</b>
5.1	CP ET EFFET VASODILATATEUR.....	43
5.2	CP ET EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE.....	45
5.3	CP ET EFFET ANTI-ATHEROGENE.....	47
5.4	CP ET HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	47
<b>6</b>	<b>LE REIN.....</b>	<b>48</b>
6.1	INTRODUCTION.....	48
6.2	VIEILLISSEMENT DU REIN.....	49
6.3	REIN ET ANTIOXYDANTS ALIMENTAIRES.....	50
<b>7</b>	<b>LE MICROBIOTE.....</b>	<b>52</b>
7.1	INTRODUCTION.....	52
7.2	MICROBIOTE ET AGE.....	52
7.3	MICROBIOTE ET COMPOSES PHENOLIQUES.....	53
	<b>POSITION DU PROBLEME.....</b>	<b>54</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>56</b>
<b>A.</b>	<b>CARACTERISATION DE LA POUDRE.....</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>EXTRACTION DES CP A PARTIR DU MARC DE RAISIN.....</b>	<b>56</b>
<b>2</b>	<b>ATOMISATION.....</b>	<b>56</b>
2.1	PRINCIPE.....	56
2.2	PROTOCOLE.....	56
<b>3</b>	<b>IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES CP TOTAUX.....</b>	<b>57</b>
3.1	DOSAGE COLORIMETRIQUE DE FOLIN-CIOCALTEU.....	57
3.1.1	<i>Principe</i> .....	57
3.1.2	<i>Protocole</i> .....	58
3.2	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP).....	58
3.2.1	<i>Principe</i> .....	58
3.2.2	<i>Protocole</i> .....	58
<b>4</b>	<b>ETUDE DES PROPRIETES ANTI-RADICALAIRES PAR LA METHODE AU DPPH.....</b>	<b>60</b>



4.1	PRINCIPE .....	60
4.2	PROTOCOLE .....	60
<b>B.</b>	<b>ETUDES <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>61</b>
	<i>IN VIVO</i> .....	61
<b>1</b>	<b>LE MODELE ANIMAL.....</b>	<b>61</b>
1.1	LE TRAITEMENT DES RATS PAR LES CP .....	61
<b>2</b>	<b>MESURE PAR ECHOCARDIOGRAPHIE DES PARAMETRES HEMODYNAMIQUES .....</b>	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>RECOLTE D'URINE ET D'EXCREMENTS .....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>MESURE DE LA CREATININURIE ET DE L'ALBUMINURIE.....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>SACRIFICE DES RATS .....</b>	<b>64</b>
	<i>IN VITRO</i> EN CHRONIQUE .....	64
<b>6</b>	<b>ETUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE .....</b>	<b>64</b>
	ETUDE DE L'APOPTOSE ET DU STRESS OXYDATIF DE L'ADN .....	64
<b>7</b>	<b>ETUDE PROTEOMIQUE PAR WESTERN BLOT .....</b>	<b>64</b>
7.1	PRINCIPE .....	64
7.2	EXTRACTION DES PROTEINES .....	65
7.3	DOSAGE PROTEIQUE.....	65
7.4	PROTOCOLE DU WESTERN BLOT .....	65
7.5	LES ANTICORPS UTILISES .....	67
<b>8</b>	<b>ELISA .....</b>	<b>69</b>
8.1	PRINCIPE .....	69
8.2	PROTOCOLE .....	69
<b>9</b>	<b>ANALYSE QUANTITATIVE DES BACTERIES DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR QPCR .....</b>	<b>69</b>
9.1	PRINCIPE.....	69
9.2	EXTRACTION D'ADN FECAL.....	70
9.3	PROTOCOLE DE QPCR.....	70
<b>10</b>	<b>DETECTION DES METABOLITES URINAIRES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE LC-QTOF.71</b>	
10.1	PROTOCOLE .....	71
	<i>IN VITRO</i> EN AIGU.....	72
<b>11</b>	<b>ISOLEMENT CELLULAIRE DES FIBROBLASTES CARDIAQUES DE RAT .....</b>	<b>72</b>
<b>12</b>	<b>TECHNIQUE D'ELECTROPHYSIOLOGIE : LE PATCH-CLAMP.....</b>	<b>74</b>
12.1	PRINCIPE.....	74
12.2	PROTOCOLE .....	75
<b>13</b>	<b>ANALYSES STATISTIQUES .....</b>	<b>77</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>78</b>
<b>1</b>	<b>CARACTERISATION DE LA POUDRE OBTENUE A PARTIR DU MARC DE RAISIN .....</b>	<b>78</b>

<b>2</b>	<b>EFFET DES CP ADMINISTRES A LONG TERME AUX RATS SUR LE VIEILLISSEMENT CARDIOVASCULAIRE.....</b>	<b>79</b>
<b>3</b>	<b>ETUDE DE L'EFFET AIGU DES CP SUR LES PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES FIBROBLASTES CARDIAQUES.....</b>	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>EFFET DES CP ADMINISTRES A LONG TERME AUX RATS SUR LE VIEILLISSEMENT RENAL .....</b>	<b>114</b>
<b>5</b>	<b>EFFET DE LA CONSOMMATION REGULIERE DES CP SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL.....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>BIOACTIVITE DES METABOLITES URINAIRES DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DE MARC DE RAISIN.....</b>	<b>124</b>
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>134</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>141</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>143</b>
<b>VII.</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>156</b>

## Table des illustrations

### Liste des figures

<b>Figure H1 : La communication intercellulaire dans le cœur (Tirziu et al., 2010).....</b>	<b>5</b>
<b>Figure H2 : Hétérogénéité de l'excitabilité cellulaire au sein du cœur .....</b>	<b>8</b>
<b>Figure H3: Le transport du Ca<sup>2+</sup> dans les myocytes ventriculaires ; le couplage excitation-contraction.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure H4: Le cycle cardiaque.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure H5 : Courbe de Frank-Starling.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure H6 : Représentation schématique des altérations structurales cardiaques liées à l'âge.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure H7 : Schéma représentatif du développement de l'hypertrophie concentrique et de l'hypertrophie excentrique (Grossman and Paulus, 2013).....</b>	<b>18</b>
<b>Figure H8 : Représentation schématique du cœur et des sarcomères lors d'une hypertrophie concentrique et excentrique (Gjesdal et al., 2011).....</b>	<b>19</b>
<b>Figure H9 : La voie de signalisation Calcineurine-NFAT dans les cardiomyocytes (Heineke and Molkentin, 2006).....</b>	<b>21</b>
<b>Figure H10 : Organigramme des trois modules MAPK (ERK, JNK et p38) (Cowan and Storey, 2003).....</b>	<b>22</b>
<b>Figure H11 : Les voies de signalisation intracellulaires qui coordonnent la réponse hypertrophique cardiaque (Heineke and Molkentin, 2006).....</b>	<b>24</b>
<b>Figure H12: Les changements au niveau des principaux composants du couplage excitation contraction cardiaque d'un cœur âgé (entourés en rouge) D'après (Fares and Howlett, 2010).....</b>	<b>28</b>
<b>Figure H13 : La classification, les structures chimiques et les nomenclatures des composés phénoliques. D'après (Rasines-Perea and Teissedre, 2017).....</b>	<b>31</b>
<b>Figure H14 : Le squelette des acides phénoliques (Costa et al., 2012).....</b>	<b>32</b>
<b>Figure H15 : Le squelette des stilbènes (Costa et al., 2012).....</b>	<b>33</b>
<b>Figure H16 : Le squelette des anthocyanidines (Costa et al., 2012).....</b>	<b>34</b>
<b>Figure H17 : Le squelette des flavan-3-ols (Costa et al., 2012).....</b>	<b>35</b>
<b>Figure H18 : Les squelettes des flavanones, isoflavones, flavonols et flavones (Costa et al., 2012).....</b>	<b>36</b>
<b>Figure H19 : Stabilisation du radical phénolique par mésomérie.....</b>	<b>37</b>
<b>Figure H20 : Les voies d'absorption et de métabolisme des composés phénoliques. D'après (Marin et al., 2015).....</b>	<b>39</b>
<b>Figure H21: Le marc de raisin issu du processus de vinification.....</b>	<b>40</b>
<b>Figure H22 : La composition du marc de raisin (Beres et al., 2017).....</b>	<b>41</b>
<b>Figure H23 : Les deux mécanismes par lesquelles les composés phénoliques stimulent la formation endothéliale de NO dans les artères (Chataigneau et al., 2003).....</b>	<b>44</b>
<b>Figure H24: Modulation des CP de la cascade de signalisation de NF- kB.....</b>	<b>46</b>

<b>Figure H25 : Les propriétés bénéfiques des antioxydants alimentaires et leur rôle dans la maladie rénale chronique (Eugenio-Perez et al., 2016).</b> .....	50
<b>Figure MM 1 : L'atomiseur</b> .....	57
<b>Figure MM 2: La poudre obtenue après atomisation</b> .....	57
<b>Figure MM 3 : Le système Chromatographie Liquide à Haute Performance (Waters Alliance, USA)</b> .....	59
<b>Figure MM 4: Différentes concentrations de CP administrées aux rats</b> .....	62
<b>Figure MM 5 : Protocole d'isolement de fibroblastes cardiaques de rat</b> .....	73
<b>Figure MM 6 : Les différentes configurations de la technique de patch-clamp</b> .....	75
<b>Figure MM 7 : Le poste de patch-clamp</b> .....	76
<b>Figure R1 : Le chromatogramme obtenue après analyse de la poudre par CLHP</b> .....	78
<b>Figure R2 : Tracés de courants enregistrés en configuration cellule entière lors de dépolarisations membranaires allant de -120 mV à 50 mV en condition contrôle, en présence de pinacidil et en présence de pinacidil 100 <math>\mu</math>M + CP 500 <math>\mu</math>M.</b> .....	112
<b>Figure R3 : Courbes I/V représentant les effets de 100 <math>\mu</math>M de pinacidil et 500 <math>\mu</math>M de CP sur les enregistrements en patch-clamp en configuration cellule-entière sur les fibroblastes ventriculaires de rat.</b> .....	113
<b>Figure R4: Microphotographies des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine, représentatives du rein de rats des différents groupes : Jeune, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20 (Grossissement x 100. Barre d'échelle : 50 <math>\mu</math>m). n=6-8/groupe.</b> .....	114
<b>Figure R5 : Microphotographie des coupes histologiques colorées au trichrome de masson, représentatives du rein de rats des différents groupes : Jeune, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20 (Grossissement x 100. Barre d'échelle : 50 <math>\mu</math>m). n=6-8/groupe.</b> .....	115
<b>Figure R6 : Histogramme représentant le taux d'ACR chez les groupes de rats jeunes, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20. n= 6-8/groupe. * p &lt; 0.05 vs. Young</b> .....	116

### Liste des tableaux

<b>Tableau H1 : Classification internationale de l'insuffisance rénale chronique (NKF N/DOQI, 2002).....</b>	<b>49</b>
<b>Tableau H2 : Effets protecteurs de certains antioxydants diététiques contre la maladie rénale chronique.....</b>	<b>51</b>
<b>Tableau MM 1 : Les anticorps primaires et secondaires et leurs concentrations utilisés pour l'analyse de l'expression des protéines d'intérêt.....</b>	<b>67</b>
<b>Tableau MM2 : Les bactéries ciblées, les températures d'hybridation et les séquences d'amorces utilisées en qPCR.....</b>	<b>70</b>
<b>Tableau MM 3: Composition des solutions utilisées pour la dissociation des fibroblastes de rats.....</b>	<b>73</b>
<b>Tableau MM 4 : Les milieux extracellulaire et intrapipette.....</b>	<b>77</b>

## Liste des abréviations

### A

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscular Actine

AV	Auriculo-ventriculaire
----	------------------------

### B

BSA	Bovine Sérum Albumine
-----	-----------------------

### C

Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	Calcium/Calmodulin dependant protein kinase
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CMs	Cardiocytes
COX	Cyclooxygénase
CP	Composés Phénoliques
CRP	Protéine C-Réactive

### D

DC	Débit Cardiaque
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**E**

EC	Excitation-Contraction
ECG	Electrocardiogramme
EDV	End Diastolic Volume
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Synthase Endothéliale
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESV	End Systolic Volume

**F**

FCs	Fibroblastes cardiaques
-----	-------------------------

**G**

GCs	Guanylyl Cyclase soluble
GPx	Glutathion Peroxydase
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
GST	Glutathion S-Transférase

**H**

HDAC	Histone Deacetylases
HE	Hématoxyline/Eosine
HO	Radical hydroxyl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen Peroxyde

**I**

ICAM-1	IntraCellular Adhesion Molecule
I $\kappa$ B	IKK Protéine kinase

IL-6	Interleukine 6
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
iNOS	Oxyde Nitrique Synthase inductible

**L**

LDL	Lipoprotéines de basse densité
LPO	Lipooxygénase

**M**

MAC	Calcification Annulaire Mitrale
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MMPs	MétalloProtéinases Matricielles
$\mu$ MTE	Micromolar Trolox Equivalent per milliliter
MyBP-C	Myosin Binding Protein-C

**N**

nA	Nanoampère
NCX	Echangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$
NFAT	Nuclear Factor of activated T cells
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire $\kappa$ B
NO	Monoxyde d'Azote
$\text{NO}\cdot$	Oxyde nitrique

**O**

$\text{O}_2\cdot^-$	Anion superoxide
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine



**P**

pA	Picoampère
PI3-Kinase	Phosphoinositide-3 Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PLA2	Phospholipase A2
PLB	Phospholamban

**Q**

qPCR	Quantitative Polymerase Chain reaction
------	--

**R**

RVT	Resvératrol
Ryr	Récepteur de la ryanodine

**S**

SA	Sino-Auriculaire
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATP-ase
SEM	Standard Error of Mean
SR	Sarcoplasmic Reticulum
SOD	Superoxyde Dismutase

**T**

TBST	Tris Buffer Salt-Tween 1x
TGF-β	facteur de croissance transformant β
TCM	Trichrome de Masson
TGF-β	Facteur de croissant transformant β

TNF- $\alpha$  Facteur de nécrose tumorale  $\alpha$

**V**

VCAM-1 Vascular Cell Adhesion Molecule

VES Volume d'Ejection Systolique

VG Ventricule gauche

VS Volume systolique

VTD Volume télédiastolique

VTS Volume télésystolique

## Introduction

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche entre l'équipe « Caractérisation des Molécules Bioactives » de l'Unité de recherche Technologies et Valorisation Agro-alimentaire de la Faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth, le laboratoire « Physiologie et Physiopathologie » de la Faculté de médecine de l'Université Saint Joseph de Beyrouth et le laboratoire « Signalisation et Transports Ioniques Membranaires » de l'Université de Poitiers.

Le vieillissement est un processus physiologique au cours duquel on assiste à un remodelage génotypique et phénotypique des différentes structures. Le stress oxydatif est considéré comme l'un des éléments clés qui influencent ce remodelage. L'ensemble de l'organisme voit son fonctionnement modifié au cours du vieillissement. Pour ne citer que quelques exemples représentatifs, on peut focaliser notre intérêt sur le cœur et les reins. Les problèmes cardiovasculaires et rénaux, sont particulièrement prégnants au sein de la population âgée (80 % du taux de mortalité et de morbidité chez les personnes âgées de plus de 65 ans). Ces dix dernières années, les molécules antioxydantes comme les composés phénoliques (CP), ont pris une place importante dans la diète humaine comme supplément nutritionnel et/ou complément thérapeutique dans la prise en charge de certaines maladies. Toutefois, les conséquences d'un usage à long terme de ces molécules visant à freiner le vieillissement cardio-rénal restent mal connues. Notre projet, a pour objectif de conduire une étude expérimentale exhaustive des effets des CP dans ce contexte de vieillissement naturel.

La méthodologie de travail consiste dans un premier temps à extraire les CP à partir de sous-produits industriels notamment le marc de raisin suivi d'une atomisation afin de conserver les CP sous forme de poudre. En deuxième lieu, nous souhaitons évaluer les effets des CP sur le remodelage cardiovasculaire et rénal observé notamment au cours du vieillissement naturel de l'organisme. Pour cela nous allons conduire plusieurs études :

- A long terme, nous allons ajouter pendant plusieurs mois des CP à la diète quotidienne de rats en cours de vieillissement. Nous étudierons ensuite l'effet de ce régime en comparant des animaux traités à des animaux contrôles sur

- des paramètres cardiovasculaires et rénaux
- le microbiote intestinal
- A court terme, les effets aigus de la poudre seront étudiés sur des fibroblastes cardiaques au cours de leur différenciation en myofibroblastes par analyse de leurs propriétés cellulaires, notamment électrophysiologies.

Ce projet est réalisé sur des rats Wistar, traités ou non par différentes concentrations de CP. Durant toute l'étude, tous les paramètres vitaux en question sont évalués à l'échelle systémique, cellulaire ou moléculaire.

## I. Etat de l'art

### 1 Le vieillissement

Le vieillissement est un processus physiologique durant lequel se produit un remodelage génotypique et phénotypique de différentes structures aboutissant à des altérations du fonctionnement normal de l'organisme au fil du temps (Queen and Tollefsbol, 2010).

Par conséquent, l'âge est un facteur de risque de développement de nombreuses maladies parmi lesquelles on peut citer par exemple les maladies cardiovasculaires (Steenman and Lande, 2017), les maladies rénales (Denic *et al.*, 2016), la démence (Querfurth and LaFerla, 2010), l'ostéoporose (Jakob *et al.*, 2014), le cancer (de Magalhaes, 2013) ou le diabète type 2 (Gunasekaran and Gannon, 2011). Le processus de vieillissement est associé également à des altérations du microbiote intestinal (Kumar *et al.*, 2016).

A l'origine des troubles observés au cours du vieillissement, les causes sont difficiles à individualiser. Pour autant, on retrouve parmi les plus communément admises (Lopez-Otin *et al.*, 2013) :

- Une communication intercellulaire altérée
- Une senescence cellulaire
- Des altérations épigénétiques
- Une modification de l'expression des gènes
- Un dysfonctionnement mitochondrial
- Un épuisement des cellules souches

Le travail réalisé au cours de cette thèse est focalisé sur certaines seulement des conséquences du vieillissement. Le système cardiovasculaire, et plus secondairement le système rénal et le microbiote intestinal ont fait l'objet d'une attention particulière, et leur évolution au cours du vieillissement sera introduite dans les parties qui suivent.

## 2 Physiologie du cœur

Le cœur, un symbole de vie, a fasciné les savants, les poètes et les médecins depuis des siècles. La physiologie cardiaque a été étudiée d'une manière intensive favorisant la compréhension de la fonction intrinsèque du cœur.

### 2.1 Les cellules cardiaques

Le myocarde est composé de cellules myocytaires et non-myocytaires. L'interaction entre les cellules et l'intégrité de la MEC sont indispensables pour une fonction cardiaque normale (**Figure H1**). Les cardiomyocytes (CMs) occupent environ 75 % du volume myocardique mais ne représentent en nombre que 25-30 % des cellules cardiaques. Les CMs sont les cellules responsables de la fonction contractile du cœur. Les cellules non-myocytaires occupent environ 70 % du cœur, parmi lesquelles on distingue majoritairement les fibroblastes, mais aussi les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Dostal *et al.*, 2015). Les fibroblastes sont impliqués dans l'homéostasie cardiaque en participant au renouvellement permanent de la matrice extracellulaire (MEC) et en exerçant une influence sur la fonction des CMs via la communication intercellulaire (Zhou and Pu, 2016).

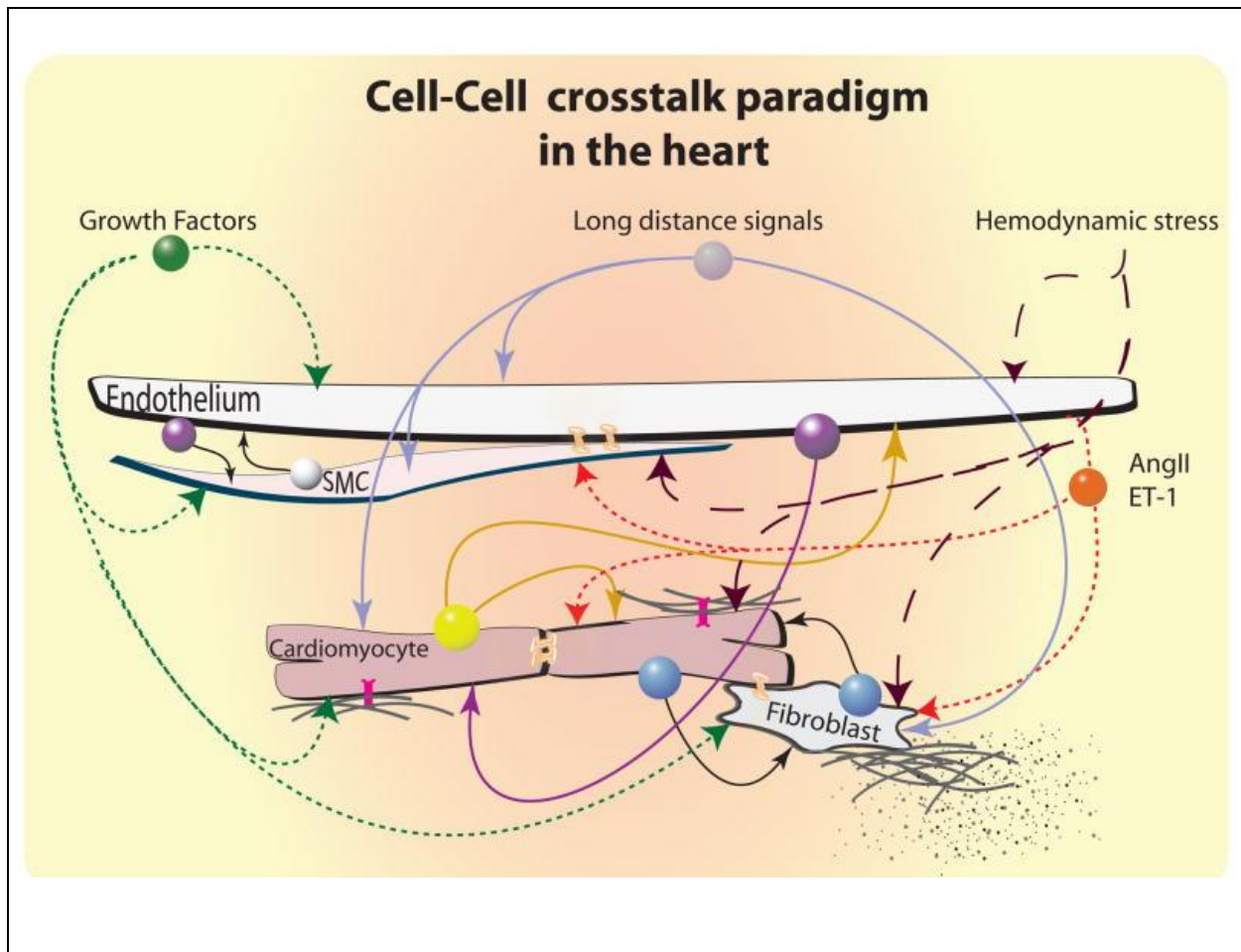
#### 2.1.1 Les cellules myocytaires

##### a. Les cardiomyocytes

Les CMs ont généralement une forme cylindrique avec une longueur allant de 50 à 120  $\mu\text{m}$  et un diamètre entre 5 et 25  $\mu\text{m}$ . Le cytoplasme des myocytes est composé principalement du noyau, de la mitochondrie, du réticulum sarcoplasmique et du réseau des protéines des éléments contractiles. Les CMs sont à la base de l'activité contractile et fournissent la force mécanique du cœur.

##### b. Les cellules nodales

Les cellules nodales sont nettement plus petites que les CMs. Elles possèdent un noyau central et un cytoplasme pauvre en myofibrilles. Elles sont localisées au niveau du nœud sinusal, du nœud atrio-ventriculaire, des faisceaux de His et des fibres de Purkinje. Les cellules nodales propagent les potentiels d'action dans l'ensemble du myocarde formant ainsi le système de conduction spécialisé du cœur.



**Figure H1 : La communication intercellulaire dans le cœur (Tirziu *et al.*, 2010)**

### 2.1.2 Les cellules non-myocytaires

#### a. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont des cellules polygonales mononucléaires. Elles recouvrent l'intérieur des vaisseaux sanguins, des cavités et des valves cardiaques. Elles interviennent dans le contrôle du tonus vasculaire par production d'une molécule endogène cardioprotectrice ayant un effet vasodilatateur : le monoxyde d'azote (NO).

#### b. Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses constituent une partie de la paroi des vaisseaux sanguins qui irriguent le myocarde. Elles sont irrégulières en forme de bâtonnet avec habituellement un seul

noyau. Les cellules musculaires lisses sont régulatrices du débit sanguin et de la pression artérielle en fonction de leur contraction et leur relaxation qui permettent de moduler le diamètre des vaisseaux.

### **c. Les fibroblastes cardiaques (FCs)**

Comme nous l'avons déjà mentionné, les fibroblastes représentent quantitativement la population cellulaire majoritaire dans le cœur. Ces cellules jouent un rôle de soutien et contribuent aux propriétés structurales, biochimiques, mécaniques et électriques du cœur.

Dans la littérature relative à la physiologie cardiaque, la majorité des études ont longtemps porté sur les CMs pour aborder le fonctionnement cardiaque. C'est récemment que différentes équipes se sont rendu compte du grand intérêt de la valorisation du rôle des FCs dans un cœur normal et durant le remodelage cardiaque. Ces cellules présentent des rôles bien distincts tels que la prolifération, la migration, la différenciation et le renouvellement de la MEC. A la suite d'un infarctus du myocarde, les FCs secrètent des médiateurs qui agissent d'une manière autocrine et/ou paracrine tels que les cytokines, les facteurs de croissance et les prostaglandines (Brown *et al.*, 2005). L'action prolongée des FCs est définie par une prolifération accrue et par conséquent une augmentation de la sécrétion de la MEC qui aide à maintenir l'intégrité structurelle du cœur (Olson *et al.*, 2005). Cette réponse réparatrice tissulaire importante est brève afin d'éviter une sécrétion accrue de collagène, une fibrose et un mal-fonctionnement cardiaque (Gurtner *et al.*, 2008). En condition pathologique, les fibroblastes peuvent se différencier en myofibroblastes, cellules peu abondantes dans le myocarde physiologique à l'exception des valves cardiaques. Les myofibroblastes jouent un rôle dans la réparation tissulaire et la fibrose par sécrétion de cytokines, de MEC et de facteurs de croissance (Kong *et al.*, 2014).

En outre, les FCs exercent une influence majeure sur la fonction des CMs via la communication intercellulaire. Bien qu'elles soient considérées comme des cellules non excitables en raison de l'absence du potentiel d'action déclenchable sur cellules isolées, une expression fonctionnelle d'une grande variété de canaux ioniques sur ces cellules a été mise en évidence, ce qui permet leur contribution à la régulation des processus physiologiques cardiaques.

L'origine des FCs, leur morphologie, leurs propriétés fonctionnelles, mécaniques et électrophysiologiques sont détaillées dans une revue que nous avons publiée dans le journal



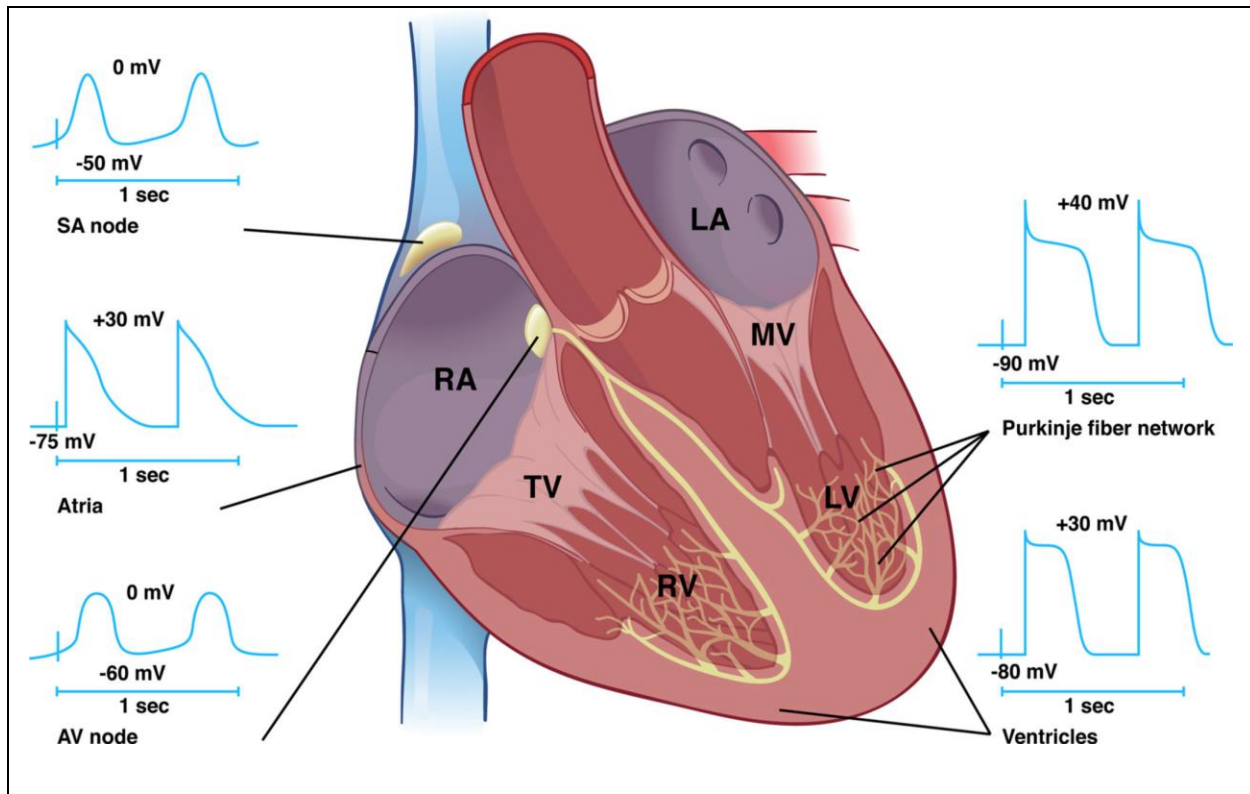
« Journal of Cellular Physiology » en 2016. Cette revue intitulée « Basic Signaling in Cardiac Fibroblasts » est annexée à ce manuscrit.

## 2.2 L'automatisme

L'autorythmicité, est l'une des caractéristiques fondamentales du cœur. L'activité cardiaque spontanée est déclenchée par le nœud sinoauriculaire (SA) du tissu nodal qui est responsable du rythme cardiaque. Ses cellules produisent spontanément des potentiels d'action, entraînant la dépolarisation et la contraction des CMs.

Comparée aux cellules auriculaires ou ventriculaires, l'activité cellulaire spontanée du nœud SA présente des propriétés particulières telles que l'absence du potentiel de repos stable. A partir du potentiel diastolique maximal, elles amorcent une dépolarisation lente qui élève le potentiel de membrane vers le seuil d'excitation au-delà duquel se déclenche le potentiel d'action. Cette phase nommée dépolarisation diastolique lente, est à la base de l'automatisme de l'activité électrique du nœud sinusal. Le nœud SA est caractérisé par une hétérogénéité cellulaire responsable d'une variation de décours de l'activité spontanée (**Figure H2**) (Munshi, 2012).

L'activité rythmique résulte de l'activation/désactivation/inactivation de canaux ioniques spécifiques qui influencent le potentiel de membrane et permet une dépolarisation diastolique lente. L'enchevêtrement des paramètres potentiel de membrane, courant ionique et temps qui évoluent les uns en fonction des autres explique la complexité du domaine de l'électrophysiologie.



**Figure H2 : Hétérogénéité de l'excitabilité cellulaire au sein du cœur**

Potentiels d'action typiques enregistrés du nœud sinusal jusqu'au myocyte ventriculaire (Munshi, 2012).

### 2.3 L'excitabilité

L'excitabilité cardiaque désigne la capacité des cellules cardiaques à subir une série d'évènements caractérisés par la dépolarisation et la repolarisation séquentielles, la communication avec les cellules adjacentes et la propagation de l'activité électrique. La cellule cardiaque génère un potentiel d'action au niveau membranaire en réponse à une stimulation par le courant de dépolarisation. Le potentiel d'action généré se propage dans les deux ventricules grâce aux jonctions gap perméables entre les cellules, ce qui permet l'excitation de toutes les cellules adjacentes. L'excitabilité cardiaque résulte également du flux des courants ioniques à travers la membrane des cellules myocytaires (Aggarwal and Makielski, 2013). Ces courants sont impliqués dans le maintien du potentiel de repos et la genèse du potentiel d'action. A titre d'exemple, on peut noter l'importance des canaux potassiques dont le rôle est la repolarisation et le maintien du potentiel de repos (Benamer *et al.*, 2013). La membrane plasmique contient aussi des canaux

chlorures dont le rôle n'est encore bien défini, des canaux sodiques qui permettent de mettre en œuvre le déclenchement et le décours du potentiel d'action au niveau ventriculaire et des canaux calciques impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique, du couplage EC et donc de la contractilité myocardique.

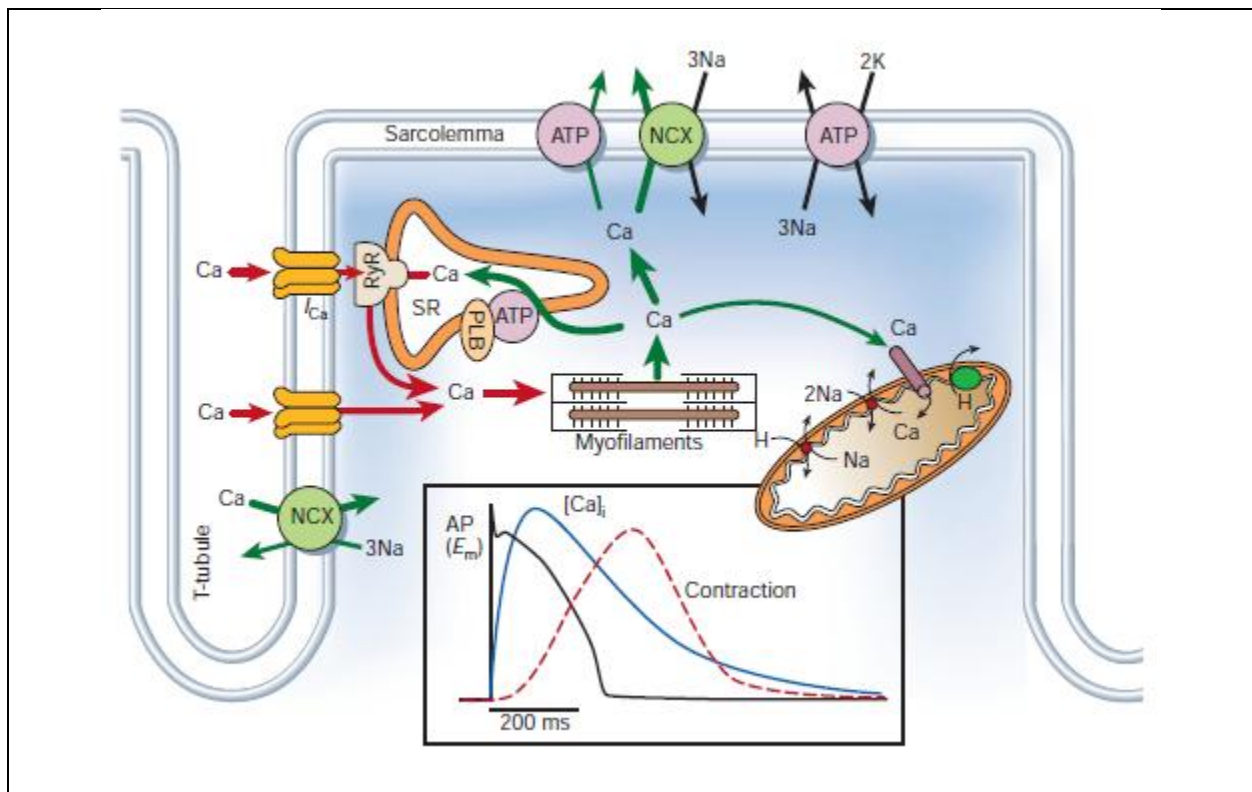
#### 2.4 Contractilité et couplage excitation-contraction (EC)

La contractilité est définie comme la force de contraction pour une longueur musculaire donnée. Un accroissement de la contractilité cardiaque résulte d'une augmentation de la stimulation sympathique. L'interaction entre la noradrénaline et son récepteur provoque une stimulation de l'adénylate cyclase qui augmente la concentration intracellulaire d'AMP cyclique. Cela induit une activation de protéines clés telles que la protéine kinase A (PKA). La PKA augmente la quantité de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) impliquée dans la contraction par phosphorylation des protéines régulatrices du mouvement du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ce qui accroît son passage du liquide interstitiel et du réticulum sarcoplasmique dans le sarcoplasme. La contractilité ventriculaire est également fortement corrélée à une phosphorylation médiée par la PKA de deux protéines myofibrillaires : la troponine I et la protéine C ou MyBP-C (myosin binding protein-C). Par suite, une plus grande quantité de sang est éjectée du cœur, ce qui abaisse le volume télésystolique. (Weishaar *et al.*, 1988) (Callaghan, 2016).

Le processus clé qui relie l'excitation électrique à la contraction cardiaque est la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$ . Les unités du sarcomère cardiaque sont formées de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine constitués par l'actine G, la tropomyosine et la troponine. La dépolarisation membranaire du sarcolemme ouvre les canaux calciques de type L, induit une augmentation locale de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui à son tour provoque la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par le réticulum sarcoplasmique suite à l'activation des récepteurs à la ryanodine (« calcium-induced calcium-release ») (Balke and Goldman, 2003). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vont se lier aux protéines contractiles telles que la troponine C et générer un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -troponine induit le glissement des myofilaments de myosine par rapport aux myofilaments d'actine, et va provoquer le raccourcissement des sarcomères et déclencher ainsi la contraction musculaire (Jafri, 2012).

Afin que le muscle cardiaque se détende de nouveau, la concentration cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  doit diminuer. Ceci est accompli principalement par le transport médié par la protéine Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase (SERCA) qui pompe le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique et par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) qui balaye le  $\text{Ca}^{2+}$  des myocytes. L'activité de la SERCA est régulée par une protéine associée, le phospholamban (PLB). Lorsque la PKA ou la  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dépendant protein kinase (CMKII) agissent sur les sites de phosphorylation du PLB, ce dernier favorise le pompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par SERCA.

D'autres structures telles que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane sarcolemme participent, mais pour une moindre part, au retour de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire à son niveau basal. La quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  entrante et sortante doit être la même à chaque battement pour éviter tout excès ou déficit en  $\text{Ca}^{2+}$  qui pourra déstabiliser la cellule (Bers, 2002) (**Figure H3**).



**Figure H3: Le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les myocytes ventriculaires ; le couplage excitation-contraction.**

NCX : échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ; RyR : récepteur de la ryanodine ; SR : réticulum sarcoplasmique ; PLB : phospholamban ; ATP : ATPase (Bers, 2002).

## 2.5 Phénomènes mécaniques

La révolution cardiaque est définie par la contraction et le relâchement (connus respectivement comme la systole et la diastole) auriculaires suivis de la systole et de la diastole ventriculaires. L'activité cardio-mécanique résulte de l'activité électrique d'un certain nombre de cellules. Elle est marquée par des variations successives de la pression et du volume sanguins à l'intérieur du cœur (**Figure H4**).

### 2.5.1 Les phases du cycle cardiaque

#### 2.5.1.1 Remplissage ventriculaire

Les ventricules se remplissent à environ 80% du sang provenant de la circulation et s'écoulant passivement des oreillettes et passant via les valves auriculo-ventriculaires ouvertes. Suivant la dépolarisation des parois auriculaires, les oreillettes se contractent et compriment le sang qu'elles contiennent. La pression auriculaire s'élève soudainement, et les 20% du sang restant sont éjectés dans les ventricules.

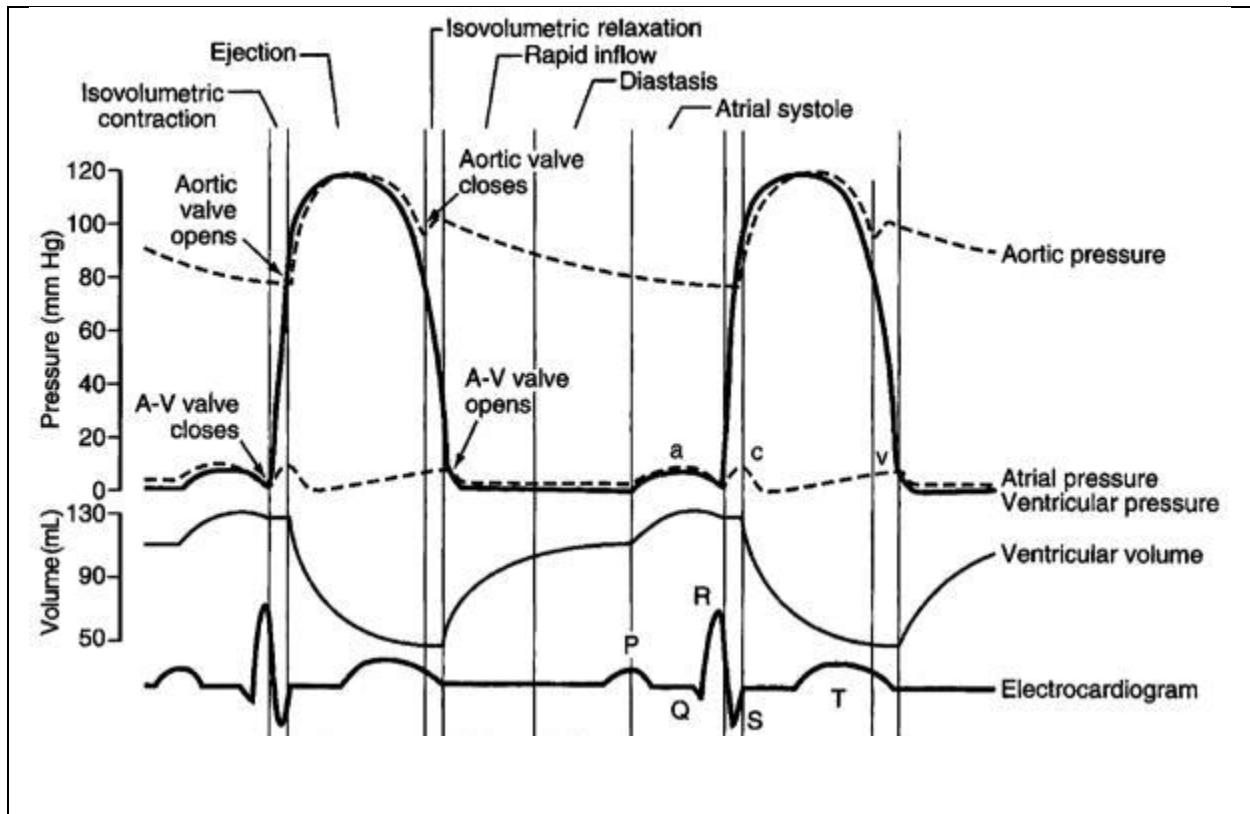
#### 2.5.1.2 Systole ventriculaire

Suite à la contraction du ventricule, la pression augmente dans la chambre ventriculaire pour devenir supérieure à la pression auriculaire, entraînant la fermeture des valves auriculoventriculaires. Toutes les issues étant fermées, le volume du sang reste constant pendant la contraction initiale des ventricules ; c'est la phase de contraction isovolumique. Quand la pression au sein des ventricules augmente pour devenir supérieure à la pression qui règne dans les artères émergeant des ventricules, le sang sera expulsé dans l'aorte et le tronc pulmonaire suite à l'ouverture des valves sigmoïdes. C'est la phase d'éjection, durant laquelle la pression ventriculaire est importante et toujours supérieure à la pression auriculaire.

#### 2.5.1.3 Relaxation isovolumétrique : protodiastole

En fin de systole ventriculaire, la pression ventriculaire tombe jusqu'à redevenir inférieure à la pression artérielle, entraînant la fermeture des valves sigmoïdes. Les valves auriculoventriculaires sont toujours fermées puisque la pression ventriculaire est toujours supérieure à la pression auriculaire. La systole est terminée, et la diastole ventriculaire commence. Dans le premier temps de cette relaxation, le ventricule est clos (valves atrioventriculaires et

sigmoïdes fermées) et conserve donc un volume de sang constant (Luisada and MacCanon, 1972; Fukuta and Little, 2008). On parle alors de relaxation isovolumique.



**Figure H4: Le cycle cardiaque**

Ce schéma illustre les variations de pression aortique, ventriculaire et auriculaire gauches ainsi que la variation du volume ventriculaire compatibles avec l'électrocardiogramme. D'après (Darvishi *et al.*, 2013).

## 2.6 Débit cardiaque

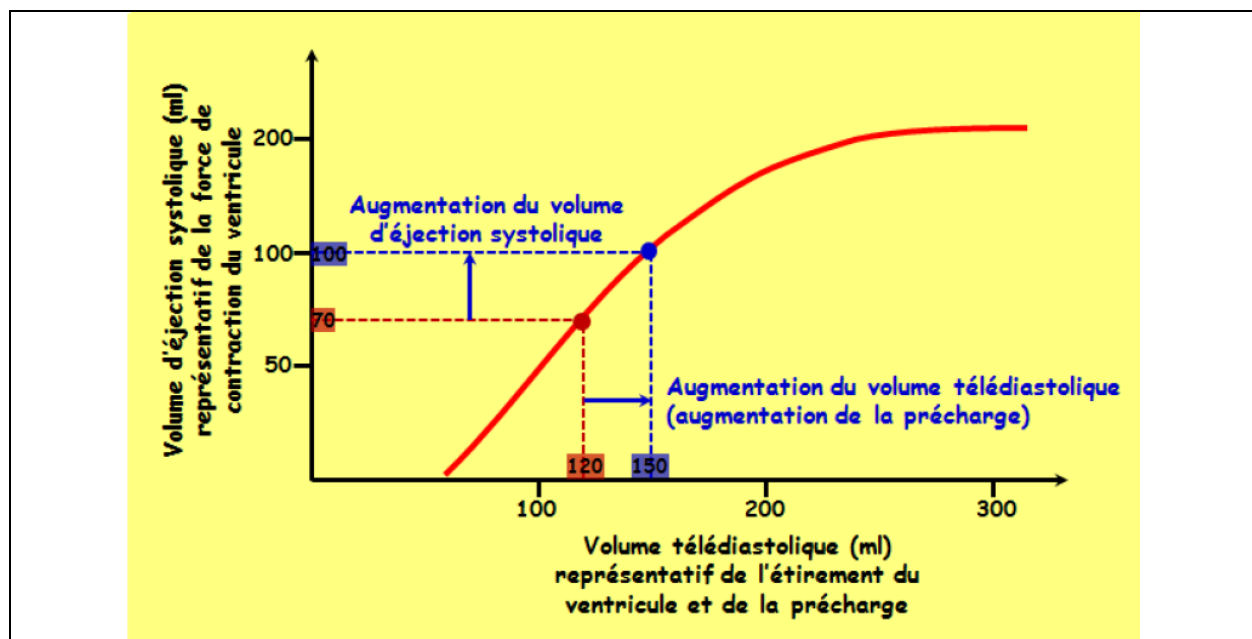
Le débit cardiaque (DC) reflète les capacités d'éjection du cœur et représente la quantité de sang en litre éjectée par chaque ventricule en une minute. Il est calculé en multipliant le volume d'éjection systolique (VES) par la fréquence cardiaque. La fréquence cardiaque désigne le nombre de battements par minute alors que le VES est le volume de sang éjecté par un ventricule à chaque battement. Il représente la différence entre le volume télédiastolique (VTD), volume de sang présent dans un ventricule à la fin de la diastole ventriculaire et le volume télésystolique (VTS) qui est le volume de sang restant dans un ventricule à la fin de sa contraction. Le DC dépend de

plusieurs paramètres tels que la contractilité, la précharge, la postcharge et la fréquence cardiaque (Carlsson *et al.*, 2012).

La contractilité et la fréquence cardiaque sont détaillées précédemment (paragraphe I.2.2 et I.2.4).

### 2.6.1 La précharge

La précharge est le degré d'étirement que présentent les cellules myocardiques juste avant leur contraction. Plus les cellules sont étirées, dans une certaine limite, plus leur capacité de contraction est forte, ce qui augmentera le débit cardiaque. Le principal facteur de l'étirement du myocarde est le degré de remplissage des ventricules qui dépend du retour veineux. Celui-ci représente la quantité de sang qui retourne au cœur par les veines et qui va donc distendre les ventricules. La loi de Frank-Starling illustrée par une courbe (**figure H5**), représente la relation entre la force de contraction et l'étirement du ventricule. Elle débute par une pente ascendante pour ensuite atteindre une phase de plateau où une augmentation de volume ne conduit plus à une augmentation de performance contractile.



**Figure H5 : Courbe de Frank-Starling.**

Extrait de <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain2f2a.html>

### **2.6.2 La postcharge**

La postcharge est la pression qui s'oppose à celles que produisent les ventricules lorsqu'ils éjectent le sang dans le système artériel. Il s'agit essentiellement de la contre-pression exercée sur les valves sigmoïdes de l'aorte et du tronc pulmonaire par le sang artériel. Si l'organisme est en bonne santé, la postcharge est relativement constante et donc n'influe pas beaucoup sur le volume systolique. Pour certaines pathologies, la postcharge est augmentée et la capacité des ventricules à éjecter le sang est donc réduite, ce qui augmente le VTS et réduit le VS (Vincent, 2008).



### 3 Vieillessement cardiaque

Le vieillissement est un processus dégénératif dû principalement à l'endommagement des macromolécules cellulaires, notamment suite à leur réaction avec les radicaux libres (Dai *et al.*, 2012a). Au cours du vieillissement du système cardiovasculaire, plusieurs changements ont lieu dans la morphologie, l'anatomie, la physiologie et la biochimie du cœur et des vaisseaux associés.

#### 3.1 Changements structurels

##### 3.1.1 Remodelage du ventricule gauche (VG)

Morphologiquement, le cœur subit un épaissement et une hypertrophie du VG et du septum interventriculaire. Au niveau cellulaire, le nombre des CMs se réduit avec l'âge et on observe un remodelage compensatoire caractérisé par l'altération de la composition de la MEC, impliquant la synthèse de fibroblastes et la dégradation du collagène par la voie de signalisation du facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ) (Nakou *et al.*, 2016). Ces altérations conduisent par la suite à une hypertrophie des cellules restantes et à un remodelage pathologique ayant comme conséquence une fibrose réactive (Horn and Trafford, 2016) (**FIGURE H6**).

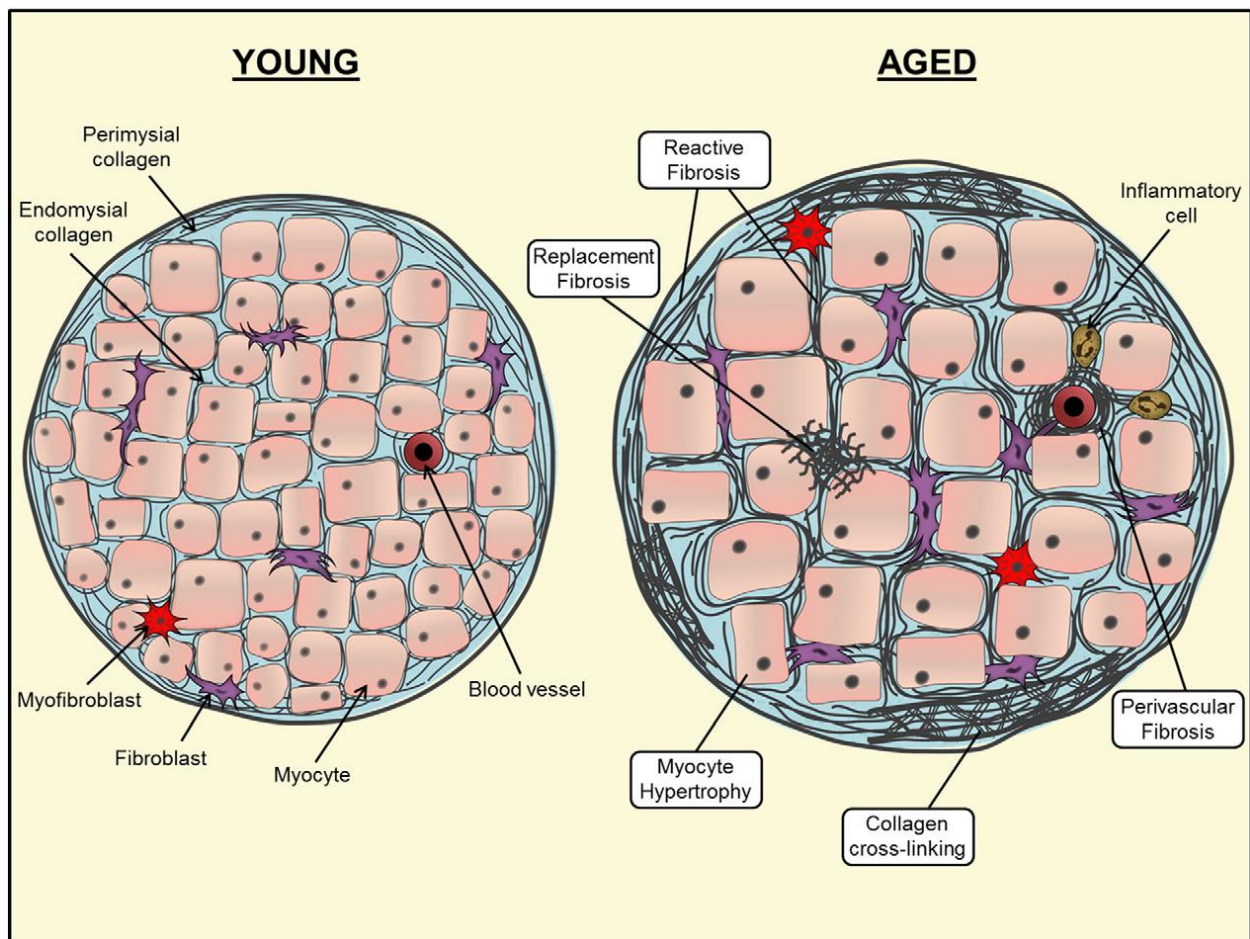
Les altérations associées au vieillissement mitochondrial et au stress oxydant sont la cause majeure de la perte myocytaire. Plus précisément, ce sont l'ensemble de :

- La diminution du transfert d'électrons
- Le potentiel de membrane mitochondrial réduit
- Le défaut de régulation de la respiration
- L'augmentation de la taille couplée à une masse réduite des mitochondries
- L'augmentation de l'oxydation des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial

qui vont favoriser l'apoptose myocytaire et la réaction inflammatoire (Martin-Fernandez and Gredilla, 2016).

Des études faites sur les rongeurs ont démontré que la teneur en collagène du VG augmente progressivement avec l'âge, et elle est souvent associée à une réduction de la contractilité cardiaque (Horn and Trafford, 2016). Le collagène représente 6 % de la teneur totale en protéines du VG de rats âgés d'1 mois ; sa valeur double chez les rats âgés de 22 mois. Plus précisément,

des autopsies du cœur d'un sujet âgé de 80 ans comparées à celles de sujets plus jeunes révèlent une augmentation du collagène I et une diminution du collagène III (Mendes *et al.*, 2012). Le collagène I est bien résistant à la traction élevée alors que le collagène III est extensible; par conséquent, un ratio élevé pourrait nuire à la biomécanique cardiaque. Par ailleurs, non seulement on observe un dépôt de collagène accru, mais aussi la capacité de dégradation de la MEC augmente en raison de l'expression élevée de métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Meschiari *et al.*, 2017).



**Figure H6 : Représentation schématique des altérations structurales cardiaques liées à l'âge.** Le remodelage cellulaire et interstitiel se produit en raison du vieillissement du myocarde. Suite à la perte myocytaire, il en résulte une hypertrophie des myocytes restants et s'installe une fibrose (Horn and Trafford, 2016).

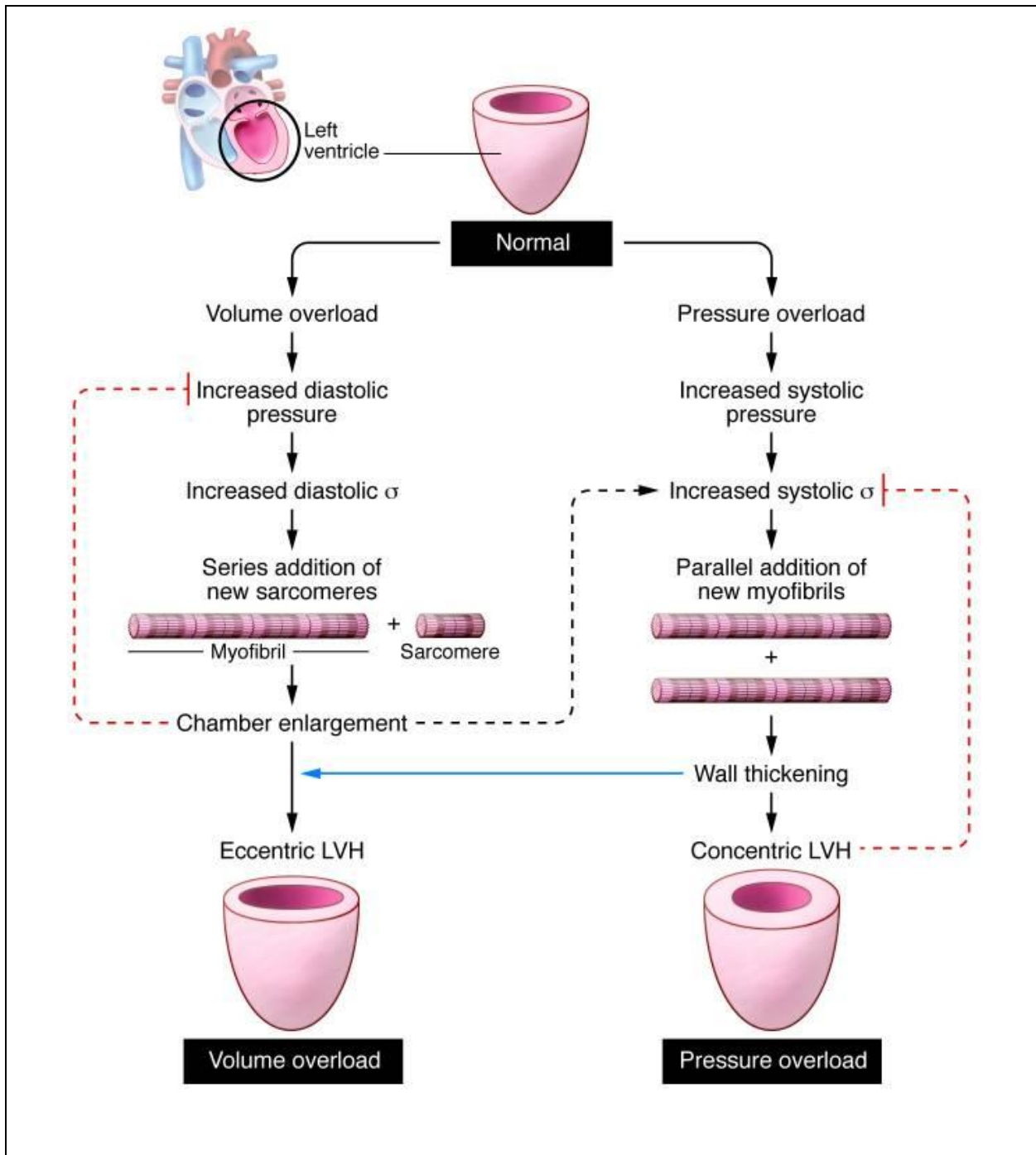
### 3.1.1.1 L'hypertrophie

L'hypertrophie est une forme de remodelage structurelle et fonctionnelle du cœur. Il existe deux types d'hypertrophie cardiaque.

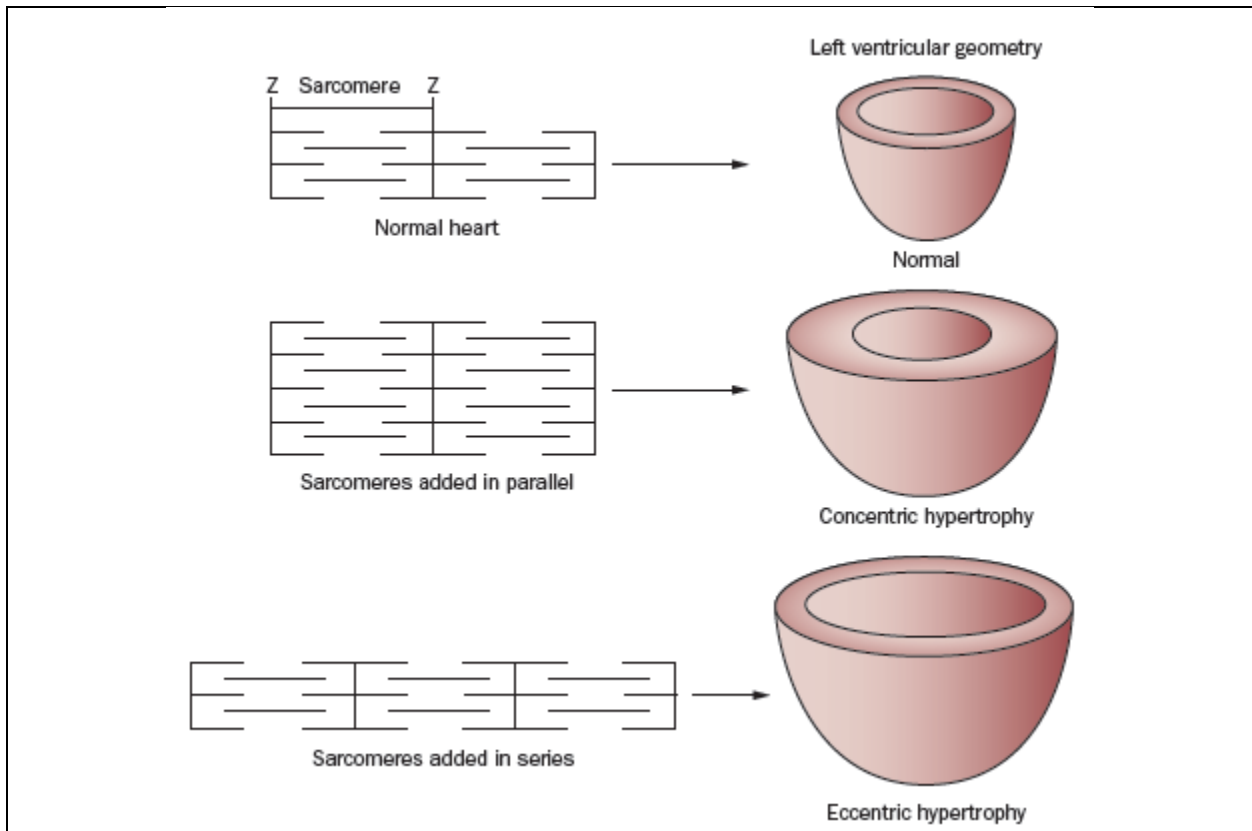
L'hypertrophie excentrique ou hypertrophie physiologique ; est l'une des caractéristiques majeures du remodelage physiologique du cœur. Elle est observée lors d'une surcharge en volume c'est-à-dire lors d'une grossesse ou d'entraînements physiques. Cette dernière est caractérisée par une augmentation de la dimension de la chambre ventriculaire et une augmentation proportionnelle de l'épaisseur du septum et de la paroi postérieure (Kehat *et al.*, 2011).

Alors que l'hypertrophie concentrique ou hypertrophie pathologique ; elle est due à une surcharge en pression et s'observe chez les patients atteints d'hypertension artérielle entre autres. Elle se caractérise par une augmentation de la masse cardiaque et de l'épaisseur des parois mais sans changement du volume de la chambre (Heineke and Molkentin, 2006) (**Figure H7**).

Au niveau cellulaire, l'hypertrophie excentrique se distingue par une addition des unités des protéines contractiles en série avec une augmentation de la longueur relativement plus importante que de la largeur des cellules. Alors qu'en hypertrophie concentrique, les protéines contractiles s'assemblent en parallèle avec une croissance latérale des cellules (**Figure H8**).



**Figure H7 : Schéma représentatif du développement de l'hypertrophie concentrique et de l'hypertrophie excentrique (Grossman and Paulus, 2013).**



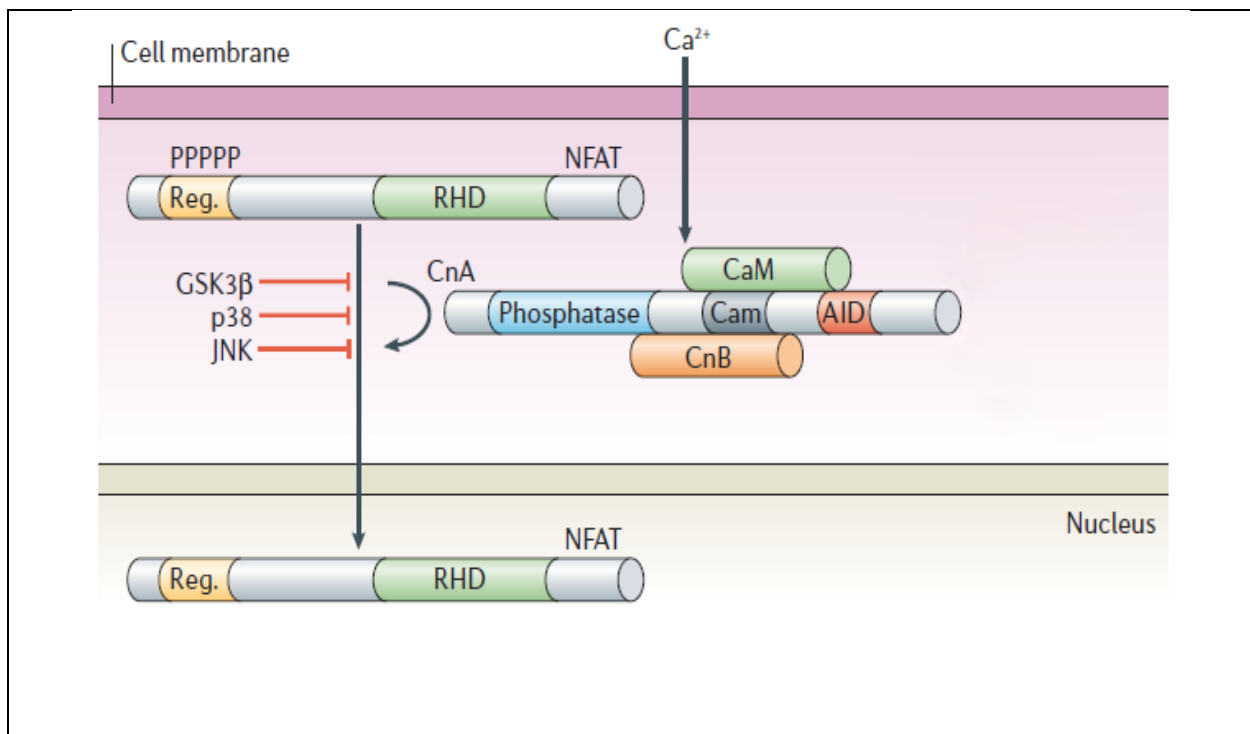
**Figure H8 : Représentation schématique du cœur et des sarcomères lors d'une hypertrophie concentrique et excentrique (Gjesdal *et al.*, 2011).**

Des études sur les modèles animaux ont révélé les médiateurs importants de l'hypertrophie cardiaque. En premier lieu les voies de signalisation telles que la voie calcineurine - Nuclear Factor of activated T cells (NFAT), puis les protéines telles que les Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et finalement la régulation de la transcription par Histone Deacetylases (HDAC) influencent tous l'hypertrophie cardiaque (**Figure H11**) (Heineke and Molkentin, 2006).

a. NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells

Le facteur nucléaire des lymphocytes T activés avait la caractéristique principale de pouvoir lier le promoteur de l'interleukine 2 dans les cellules T activées. La caractérisation moléculaire de toutes les protéines de la famille NFAT a mis en évidence que leur expression n'est pas limitée aux cellules T. Le cœur est parmi les organes où les protéines NFAT sont impliquées dans le développement. La famille NFAT comprend 5 membres. Dans cette étude on s'intéresse à la NFAT 4 (connue aussi par NFATx ou NFATc3). La régulation de NFAT 4 est faite via le  $Ca^{2+}$  et la calcineurine (Macian, 2005). La calcineurine est une phosphatase serine/thréonine qui déphosphoryle les molécules NFAT, favorisant ainsi leur déplacement vers le noyau où elles vont déclencher l'hypertrophie (Mudd and Kass, 2008) (**Figure H9**). Par conséquent, la voie de signalisation intracellulaire « calcineurine-NFAT » est connue pour être responsable de pathologies cardiaques majeures telles que l'apoptose des CMs et l'hypertrophie cardiaque (Lunde *et al.*, 2011). Il a été démontré également que le vieillissement induit une hypertrophie cardiaque par expression de NFATc3 et d'ERK1/2/JNK (Liao *et al.*, 2015).

Une autre molécule impliquée dans l'hypertrophie cardiaque est la  $Ca^{2+}$ /calmoduline dépendante kinase II (CaMKII). L'expression de CaMKII dans le myocarde est impliquée dans l'hypertrophie, l'insuffisance et l'arrêt cardiaque alors que son inhibition réprime ces phénotypes (Anderson, 2009).

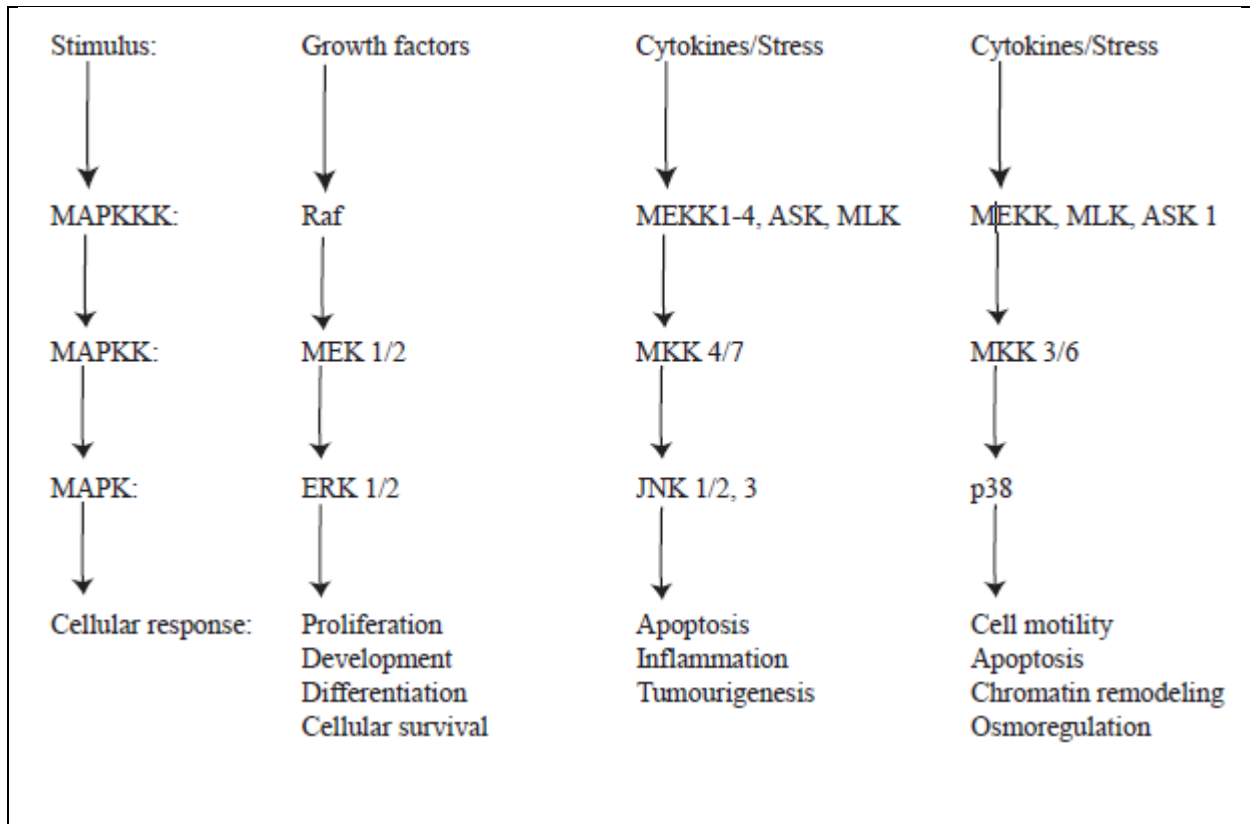


**Figure H9 : La voie de signalisation Calcineurine-NFAT dans les cardiomyocytes (Heineke and Molkenin, 2006).**

La calcineurine, une protéine phosphatase activée par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire, se lie et déphosphoryle les facteurs de transcription NFAT dans le cytoplasme d'où leur translocation vers le noyau où ils stimulent l'expression des gènes de l'hypertrophie. Trois kinases pourraient empêcher la translocation de NFAT via sa phosphorylation ; ce sont le glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), le p38 et le c-Jun N-terminal kinases (JNK).

#### b. MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

Les MAPK constituent un réseau de signalisation intracellulaire qui gouverne le développement et la pathogenèse cardiaque. Une séquence de kinases agit tout en aboutissant à la phosphorylation et par suite l'activation de p38, du extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) et de JNK. Ces MAPK à leur tour vont phosphoryler leurs protéines cibles surtout nucléaires telles que les facteurs de transcription (**figure H10**) (Cowan and Storey, 2003).



**Figure H10 : Organigramme des trois modules MAPK (ERK, JNK et p38) (Cowan and Storey, 2003).**

Cet organigramme montre les stimuli, la cascade régulatrice des trois récepteurs dans chaque module (les niveaux MAPK, MAPKK et MAPKKK) et les différentes réponses cellulaires déclenchées par MAPK.

#### - ERK1/2

La voie MEK1-ERK1/2 est probablement la première voie de signalisation identifiée capable d'orienter vers le mode d'hypertrophie des CMs. L'activation d'ERK1/2 conduit spécifiquement à une hypertrophie cardiaque concentrique, alors que l'inhibition d'ERK 1/2 aboutit à une hypertrophie excentrique (Kehat and Molkentin, 2010). Plus spécifiquement, en cas de surcharge de pression, la voie MEK1-ERK1/2 agit tout en favorisant l'ajout des sarcomères en parallèle avec une augmentation de la largeur des cellules. En revanche, lors de la surcharge volumique, la voie ERK agit contre cette machinerie et conduit la cellule vers l'élongation. Entre autres, il est probable que la surcharge volumique agisse éventuellement en inhibant légèrement la voie ERK 1/2 pour favoriser l'ajout des sarcomères en série (Kehat *et al.*, 2011).



- P 38

Dans les cellules de mammifères, les isoformes de p38 sont activées par le stress et les cytokines inflammatoires. Le p38 est impliqué dans les réponses fonctionnelles des macrophages et des neutrophiles et intervient également dans l'apoptose et la différenciation des lymphocytes T en régulant la production de l'interféron gamma (Roux and Blenis, 2004).

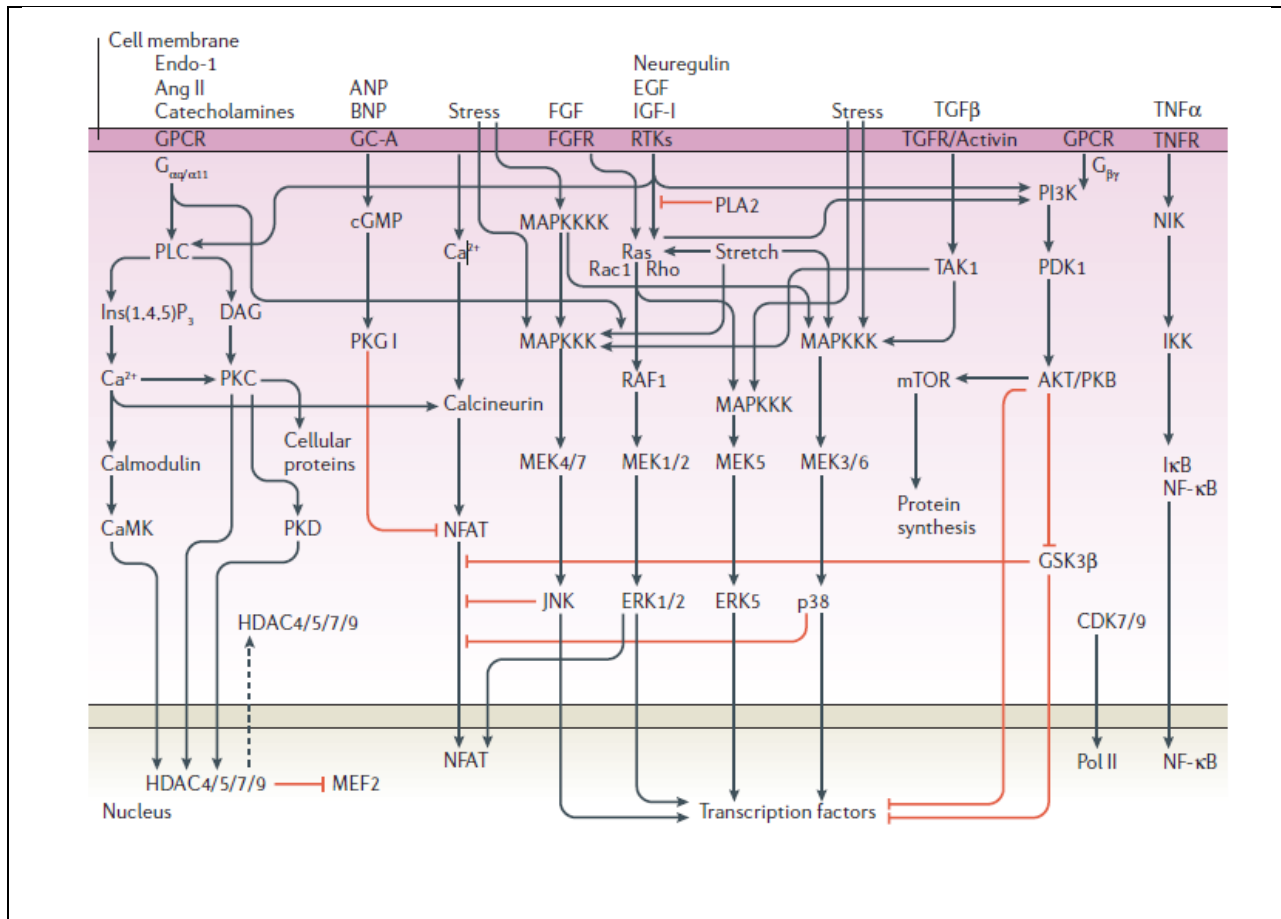
- JNK

Brièvement, l'activation de la cascade de signalisation JNK aboutit généralement à l'apoptose et joue un rôle important dans la tumorigenèse et l'inflammation.

c. HDAC

Les histones deacétylases font partie des régulateurs de l'hypertrophie cardiaque par altération de l'expression des gènes médiés par le remodelage de la chromatine. Les histones favorisent la condensation de la chromatine, empêchant ainsi les facteurs de transcription d'accéder à l'ADN. La classe II HDAC (HDAC4, HDAC 5, HDAC 6, HDAC 7, HDAC 9 et HDAC 10) impliquée dans l'hypertrophie cardiaque, comprend des extensions N-terminales qui interagissent avec des cofacteurs de transcription positifs et négatifs. Les régions N-terminales contiennent également deux sites de phosphorylation  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dépendant protein kinase (CaMK). La phosphorylation de HDAC par une des kinases activées par le stress (comme la protéine kinase D ou CAMKII), résulte en un couplage de HDAC aux protéines chaperonnes 14-3-3, induit le transport de HDAC du noyau vers le cytoplasme et aboutit à la dissociation de HDAC de la machinerie de transcription (Zhang *et al.*, 2002; Gallinari *et al.*, 2007).

*In vivo*, l'hypertrophie induite par l'activation de la calcineurine ou par une surcharge de pression est associée à une augmentation de la phosphorylation de la sérine de HDAC 5 et HDAC 9, d'où la suggestion que la régulation de la chromatine peut contrôler la réponse hypertrophique (Heineke and Molkenin, 2006). Par conséquent, les agents qui empêchent la phosphorylation de la classe II HDAC pourraient contrôler l'hypertrophie activée par le stress.



**Figure H11 : Les voies de signalisation intracellulaires qui coordonnent la réponse hypertrophique cardiaque (Heineke and Molkenin, 2006).**

### 3.1.1.2 L'inflammation

Le vieillissement est souvent couplé à des changements immunitaires, hormonaux et adipeux conduisant à un état inflammatoire chronique (Wu *et al.*, 2014). Une inflammation systémique mineure caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires est associée au développement de maladies graves âge dépendantes, telles que les maladies cardiovasculaires. Souvent, un lien étroit est établi entre l'oxydation et l'inflammation. Une production excessive ou incontrôlée de radicaux libres pourrait induire une réponse inflammatoire et vice versa. A titre d'exemple, dans le myocarde, un processus inflammatoire chronique aboutit à des dommages mitochondriaux entraînant une augmentation des radicaux libres qui activent davantage le cercle vicieux inflammatoire chronique (Lopez-Candales *et al.*, 2017). Sans un

mécanisme de défense approprié, cette boucle de rétroaction positive cause des dommages oxydatifs, la réduction de la production d'ATP, la perte des CMs et la formation de tissu fibreux.

Le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), la cyclooxygénase 2 (COX-2), la CRP et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) sont les principaux marqueurs protéiques de la voie inflammatoire cardiaque (Liao *et al.*, 2015).

### 3.1.1.3 La fibrose

La MEC qui joue d'habitude un rôle crucial dans le processus de remodelage naturel, est disproportionnellement régulée pour favoriser le processus de sécrétion lors de conditions pathologiques. Bien que l'abondance de la MEC puisse être réparatrice, ce déséquilibre pourrait entraîner des changements non souhaitables (Wynn, 2008). L'idéal serait de remplacer la région où il y a une perte myocytaire par une cicatrice structurelle, mais dans certain cas, l'excès de dépôts de la MEC couvre des sites autres que la lésion primaire. L'ensemble du mécanisme entraîne une fibrose (Dostal *et al.*, 2015). Le processus de vieillissement naturel pourrait être cité parmi les conditions physiopathologiques qui peuvent induire une fibrose (Berk *et al.*, 2007). Les conséquences de la fibrose sur la fonction cardiaque sont nombreuses. Une synthèse accrue de la MEC provoque un dysfonctionnement diastolique et une rigidité mécanique. Au cas où cette situation dure longtemps, elle peut entraîner des modifications de l'expression génique associées à l'hypertrophie ventriculaire et à un dysfonctionnement systolique (Brown *et al.*, 2005; Chaturvedi *et al.*, 2010).

Au niveau cardiaque, on distingue deux types de fibrose, la fibrose réparatrice (ou de remplacement) et la fibrose réactive. La fibrose réparatrice apparaît au cours d'une ischémie ou d'une senescence. Elle se caractérise par un dépôt excessif de collagène dans la MEC en réponse à la mort de CMs. La fibrose réactive, quant à elle, apparaît au cours de maladies inflammatoires telle que la myocardite. Il est observé une accumulation accrue de protéines matricielles en parallèle avec la présence de cellules inflammatoires. Cette fibrose peut être interstitielle lorsque le dépôt excessif de collagène se fait dans l'espace intermusculaire, ou périvasculaire lorsque l'accumulation de collagène a lieu dans l'adventice des artères coronaires (Manabe *et al.*, 2002).

### 3.1.2 Changements valvulaires

Les variations valvulaires dépendantes de l'âge sont définies principalement par un raidissement et une calcification de la valve aortique autrement appelés sclérose aortique. Les personnes âgées atteintes d'une sclérose aortique sont plus à risque de maladies cardiovasculaires et de mortalité étant donné que celle-ci se développe simultanément avec une athérosclérose dans d'autres vaisseaux. Contrairement à la sténose, la sclérose aortique n'obstrue le flux sanguin que si elle progresse à un état de calcification et de rigidité sévère (Otto, 2004). La calcification annulaire mitrale (ou MAC) est également associée au vieillissement. Il s'agit d'une accumulation de dépôts de  $Ca^{2+}$  tout au long de l'anneau de la valve mitrale et se traduit par une réduction du débit sanguin (O'Neal *et al.*, 2017).

### 3.1.3 Système de conduction

La réduction apoptotique des cellules pacemaker des nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire, la MAC, la multiplication des fibroblastes et le dépôt de collagène, de tissu adipeux et d'amyloïdes sont tous responsables d'un changement au niveau du signal électrique du myocarde (Khurana *et al.*, 2013). Une réduction de moins de 10% des cellules pacemaker cardiaques entraîne une augmentation du temps de conduction nodale. La fréquence cardiaque est non seulement affectée par cette perte, mais également par les changements structurels que subit le cœur avec l'âge, y compris la fibrose et l'hypertrophie, qui sont responsables du ralentissement de propagation du potentiel d'action dans le cœur (Nakou *et al.*, 2016).

## 3.2 Changements fonctionnels

Le vieillissement est associé à un déclin aléatoire de la fonction de l'organisme réduisant ainsi sa viabilité et sa capacité à se reproduire.

### 3.2.1 Fonction systolique

Le vieillissement cardiaque en soi entraîne un déclin significatif de la fraction d'éjection qui reflète la fonction systolique du VG (Meschiari *et al.*, 2017). Également, la capacité de modulation de la fréquence cardiaque et la réponse à l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques diminuent.

Une réduction du débit cardiaque à la suite du déclin de la fonction cardiaque avec l'âge, stimule le myocarde à compenser par augmentation de sa masse musculaire. Bien que cette compensation améliore à court terme le débit, l'hypertrophie résultante affaiblira la contractilité et la fraction d'éjection cardiaque.

### 3.2.2 Fonction diastolique

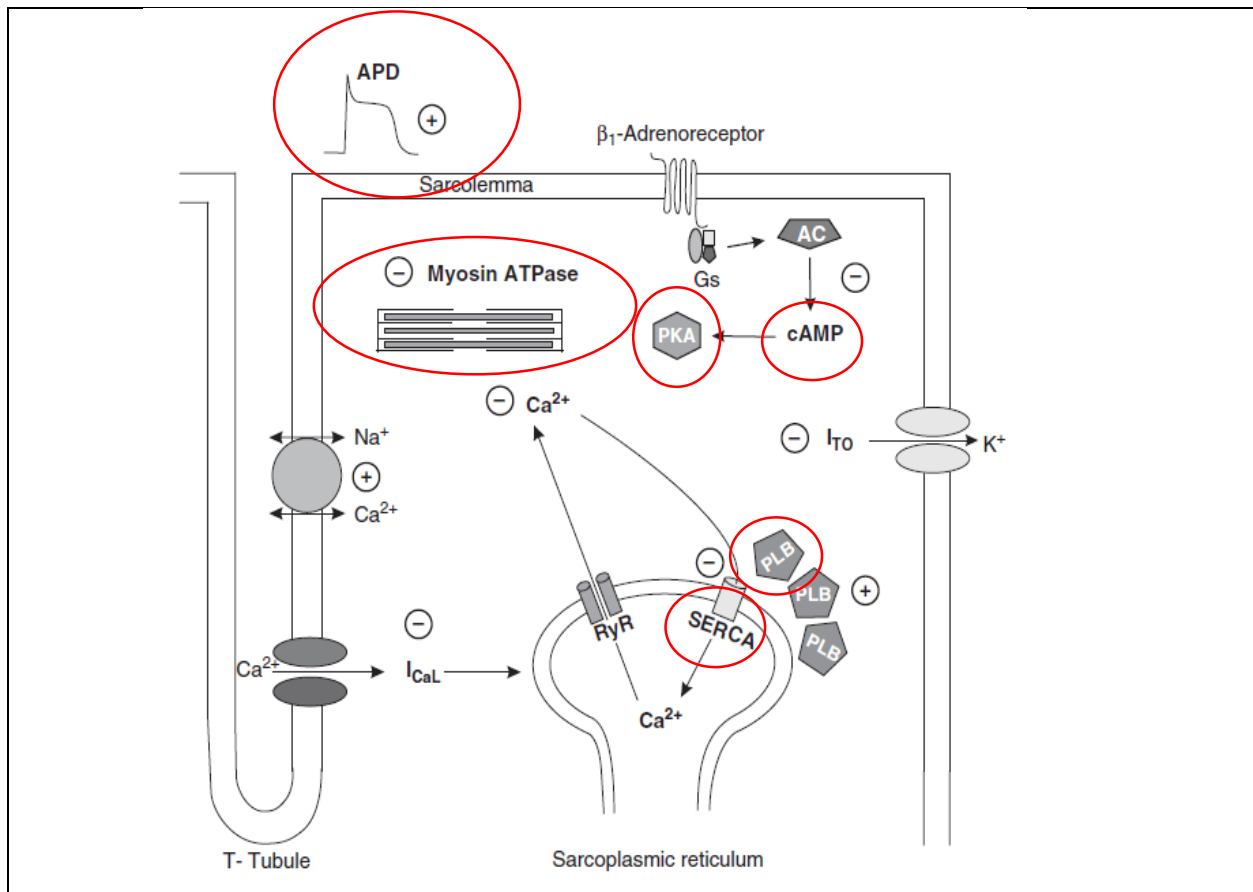
Avec l'âge, un certain nombre de changements sont observés lors de la phase diastolique du cycle cardiaque. Le taux de remplissage diastolique précoce du VG se réduit progressivement au cours du vieillissement. Cette réduction est attribuée d'une part aux modifications de la structure de la paroi ventriculaire gauche qui tend à devenir plus rigide avec l'âge et/ou d'autre part à une activation résiduelle des myofilaments depuis la systole qui provoque une relaxation isovolumique prolongée. Une durée de relaxation plus longue dans le muscle cardiaque sénescence résulte de même d'une réduction âge-dépendante de SERCA2a et de la phosphorylation du PLB (Strait and Lakatta, 2012).

### 3.2.3 Couplage excitation-contraction (EC)

L'étude de l'effet de l'âge sur les mécanismes impliqués dans le couplage EC au niveau du myocyte ventriculaire individuel est indispensable pour comprendre l'impact du vieillissement sur la fonction contractile. La contractilité cardiaque d'un cœur âgé est ralentie principalement à cause des facteurs suivants (**Figure H12**) (Fares and Howlett, 2010) :

- Le prolongement de la durée du potentiel d'action.
- La modification des protéines contractiles : le passage de la chaîne lourde  $\alpha$ -myosine à la chaîne lourde  $\beta$ -myosine d'où l'activité réduite de la myosine ATPase dans un cœur âgé.
- Le changement de SERCA2a. la principale isoforme de SERCA exprimée dans le cœur. Il s'agit d'une réduction âge dépendante de la capacité de SERCA2a à séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique, d'où l'augmentation de la concentration cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  affectant ainsi la contractilité cardiaque.
- La surexpression du phospholamban (PLB) avec l'âge, étant un inhibiteur endogène, pourrait causer le ralentissement de l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  qui restera ainsi plus longtemps dans le cytosol.

- Une moindre stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques à cause de la réduction de la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).
- La réduction de la protéine kinase A (PKA) avec l'âge. La PKA est responsable de la phosphorylation du PLB qui agit à son tour sur SERCA2a et favorise la relaxation cardiaque. Une fois son activité est réduite avec l'âge, la contraction du cœur âgé est ralentie.



**Figure H12: Les changements au niveau des principaux composants du couplage excitation contraction cardiaque d'un cœur âgé (entourés en rouge) D'après (Fares and Howlett, 2010).**

### **3.3 Les stratégies interventionnelles “Anti-âge” pour le vieillissement cardiaque**

#### **3.3.1 La restriction calorique**

La restriction calorique avec un apport nutritionnel adéquat est une intervention adaptée afin d'augmenter la durée de vie et réduire l'apparition de pathologies âge-dépendantes. Chez les rongeurs, une réduction de la consommation calorique de 30 à 60 % comparée à la consommation ad libitum (peu après le sevrage jusqu'à l'âge de 6 mois) a entraîné une augmentation proportionnelle de 30 à 60 % de la durée de vie maximale. Alors qu'une réduction de 44% de l'apport calorique débuté à l'âge adulte (12 mois) a seulement prolongé la durée de vie de 10 à 20%. Evidemment, la restriction calorique a abouti à des changements hormonaux, métaboliques et fonctionnels bénéfiques, favorisant le prolongement de la durée de vie (Fontana and Klein, 2007).

#### **3.3.2 Recours aux antioxydants**

Plusieurs études ont confirmé que le stress oxydatif est impliqué dans plusieurs maladies, y compris les maladies cardiovasculaires. Des essais effectués *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'apport alimentaire des antioxydants peut être bénéfique en tant que traitement adjuvant pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies. La théorie du « French paradox », est un exemple, de l'effet protecteur des CP sur la santé humaine. Selon cette théorie, une consommation, régulière et modérée, de vin aurait des effets bénéfiques sur la prévention des maladies cardiovasculaires malgré une consommation importante de graisses saturées dans la population française. Cet effet protecteur a été attribué aux CP présents dans le vin. Comme je le détaillerai dans le chapitre suivant, ces derniers semblent activer les voies qui augmentent les enzymes antioxydantes (FOXO, AMPK, Nrf2) et en même temps réprimer les voies pro-inflammatoires, pro-fibrotiques et pro-apoptotiques (NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt, TGF- $\beta$ /Smad, ERK 1/2) (Dai *et al.*, 2012a).

## 4 Les composés phénoliques (CP)

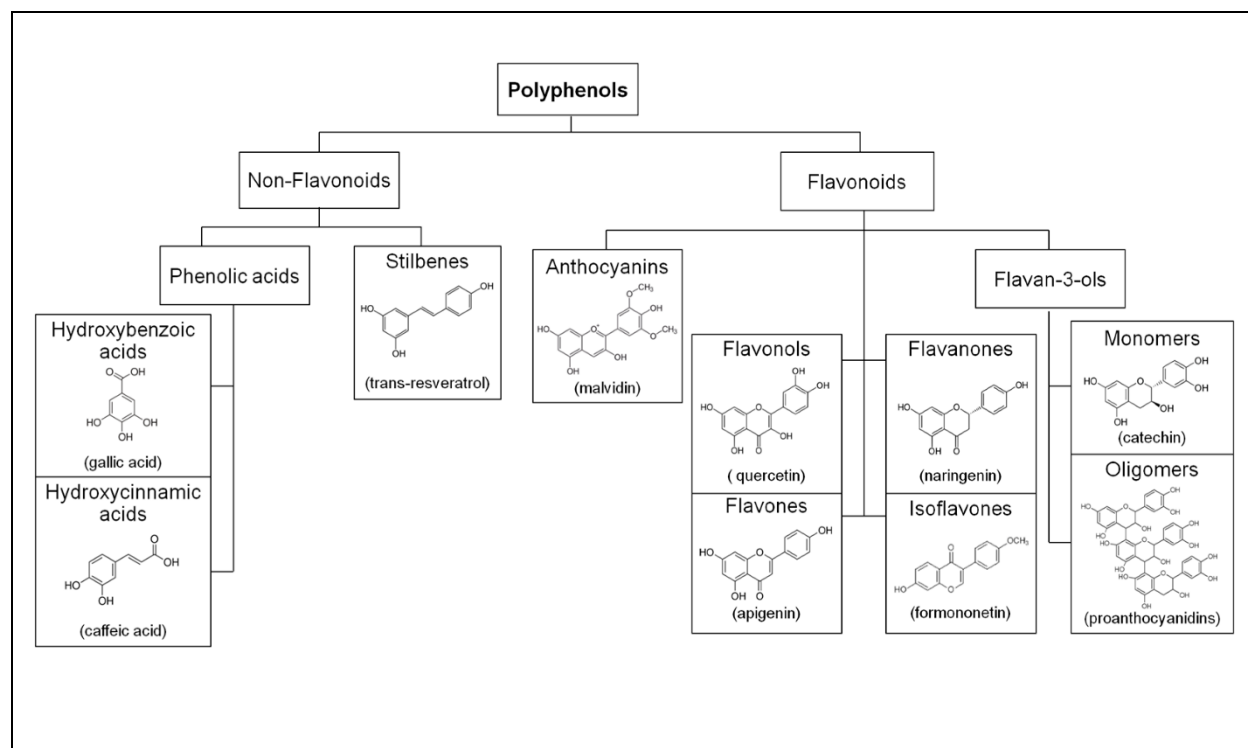
### 4.1 Généralités

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires les plus répandus dans les plantes contribuant principalement à leur mécanisme de survie (Cheynier *et al.*, 2013). Il existe un lien entre les organismes dans lesquels on trouve les CP et leur environnement biologique. Ces composés présentent des rôles défensifs contre les rayons ultraviolets, le stress oxydatif, les agents pathogènes et d'autres facteurs de stress (Bhattacharya *et al.*, 2010). Leur distribution quantitative est variable en fonction du type de la plante et de son organe, et dépend également de plusieurs facteurs comme la génétique, la maturité et les conditions climatiques (Pimpao *et al.*, 2013). Au cours des dernières décennies, plusieurs équipes ont montré que le rôle des CP ne se limite pas à la couleur, la saveur, l'odeur, l'amertume et l'astringence des aliments. Grâce aux recherches intensives qui se déroulent chaque année, les matrices riches en CP ont été classées comme aliments nutraceutiques, en raison de leurs effets positifs sur la santé (Pandey and Rizvi 2009). Ce sont des molécules actives qui possèdent des propriétés physiologiques parmi lesquelles des effets antidiabétiques, anti-allergènes, antimicrobiens, anti-thrombotiques, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, anti-hypertensifs antiarthritiques et surtout des effets antioxydants protégeant le corps des effets délétères des radicaux libres de l'oxygène (Pignatelli *et al.*, 2006; Conforti *et al.*, 2008; Hanhineva *et al.*, 2010). Les fruits, les légumes, les céréales et les boissons tels que le vin, le thé, le cidre et la bière, font partie d'un régime alimentaire riche en CP (Pandey and Rizvi 2009). L'équipe « Caractérisation des Molécules Bioactives » de l'Unité de recherche Technologies et Valorisation Agro-alimentaire de la Faculté des sciences de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, s'intéresse depuis une quinzaine d'années à optimiser l'extraction des CP à partir de différentes matrices alimentaires et à étudier leurs propriétés bioactives. Ce travail mené en étroite collaboration avec le laboratoire « Physiologie et Physiopathologie » de la Faculté de médecine de l'Université Saint Joseph de Beyrouth et le laboratoire « Signalisation et Transports Ioniques Membranaires » de l'Université de Poitiers rentre dans le cadre de la caractérisation *in vivo* des propriétés bioactives des CP extraits à partir du marc de raisin.



## 4.2 Classification des composés phénoliques

Sur le plan structurel, en fonction de la nature chimique des groupes fonctionnels, les CP se caractérisent par une grande diversité allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire à des composés hautement polymérisés (Balasundram *et al.*, 2006). Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, et dont le nombre exerce une influence majeure sur leur pouvoir antioxydant tels que la capacité à chélater des ions métalliques et/ou à capter les radicaux libres d'oxygène. Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et les flavonoïdes (Ignat *et al.*, 2011) (**Figure H13**).



**Figure H13 : La classification, les structures chimiques et les nomenclatures des composés phénoliques. D'après (Rasines-Perea and Teissedre, 2017).**

### 4.2.1 Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes comprennent les acides phénoliques porteurs d'une chaîne latérale insaturée, mais également les stilbènes dont la molécule la plus connue est le resvératrol (RVT).

#### 4.2.1.1 Les acides phénoliques

Ils consistent en 2 sous-groupes : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure H14).

- Les acides hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques sont les acides phénoliques les plus simples trouvés dans la nature, ils possèdent tous en commun une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Cinq acides benzoïques appartiennent à ce groupe, ce sont les acides : gallique, *p*-hydroxybenzoïque, protocatechuique, vanillique et syringique (Balasundram *et al.*, 2006).

- Les acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques qui possèdent 9 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ces substances sont caractérisées par un cycle benzénique, un groupe carboxylique et un ou plusieurs groupes méthoxyle et/ou hydroxyles dans la molécule. Parmi les acides cinnamiques, les acides *p*-coumarique, férulique, caféique et sinapique sont les plus communs dans la nature (Reis Giada, 2013)

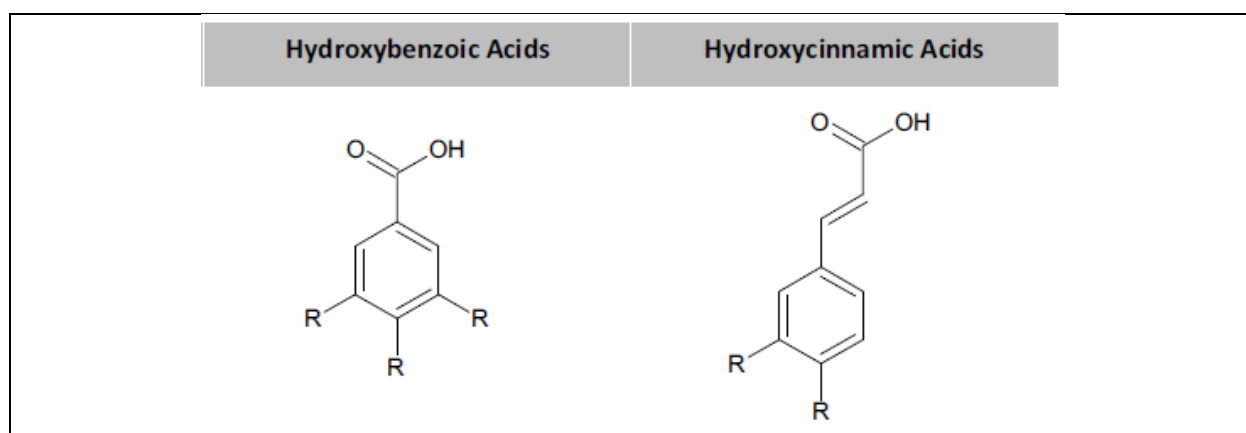
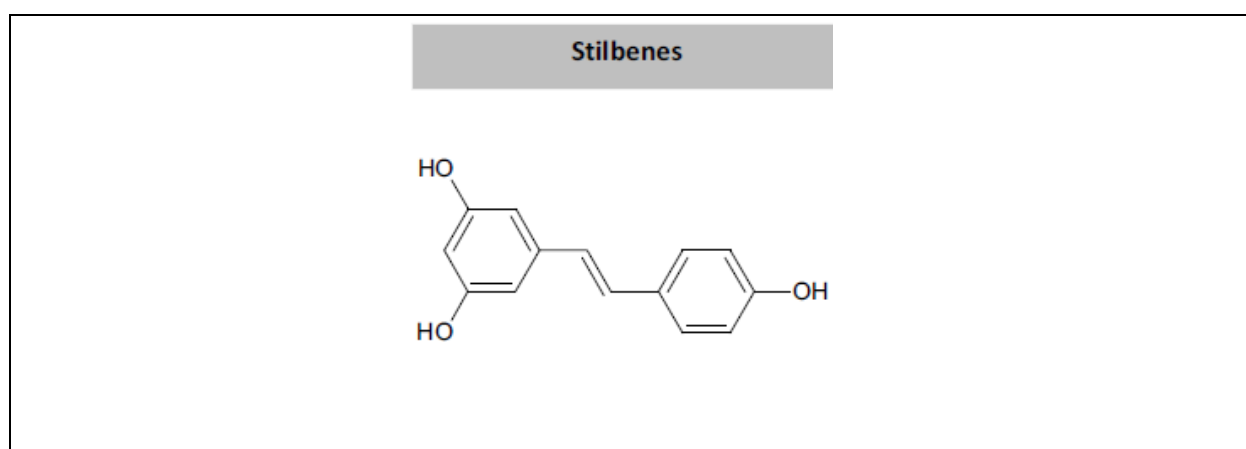


Figure H14 : Le squelette des acides phénoliques (Costa *et al.*, 2012)

#### 4.2.1.2 Les stilbènes

Les stilbènes contiennent au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison (**Figure H15**). Le représentant principal est le RVT qui existe sous 2 formes d'isomères, cis et trans. Il a été détecté dans plus de 70 espèces végétales y compris les raisins, les baies et les arachides. Sa quantification varie en fonction du cépage (D'Archivio *et al.*, 2007). Comme nous aurons l'occasion de détailler plus loin, le RVT a fait l'objet d'un grand nombre d'études mettant en évidence un rôle protecteur sur un grand nombre de paramètres cardiovasculaires.



**Figure H15 : Le squelette des stilbènes (Costa *et al.*, 2012)**

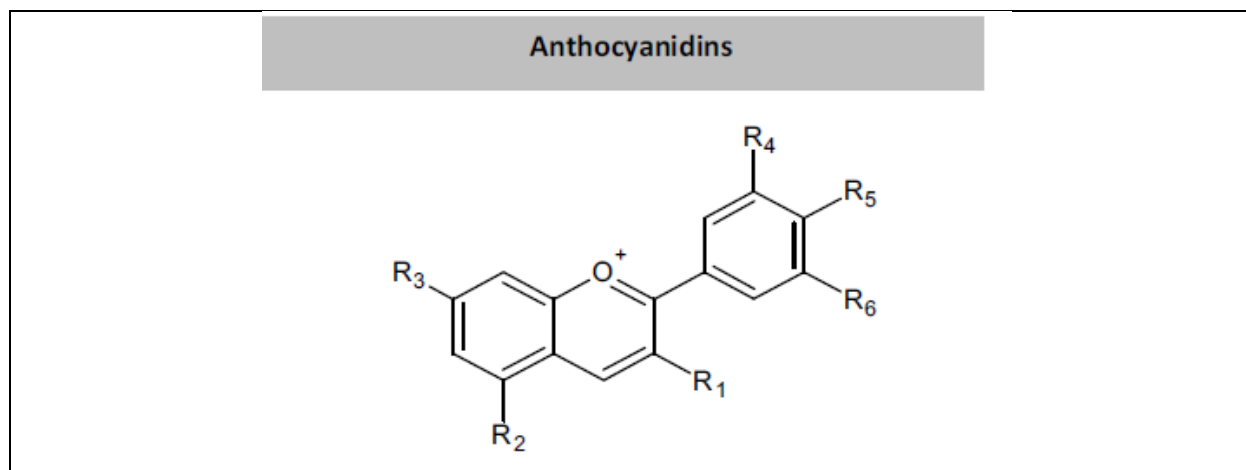
#### 4.2.2 Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes représentent la majorité des CP dans les plantes. Ces molécules possèdent un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques. La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes (Kumar and Pandey, 2013).

##### 4.2.2.1 Les anthocyanes

Ce sont des colorants naturels qui ont suscité un intérêt croissant en raison de la large gamme de couleurs qu'ils fournissent aux fruits et fleurs des plantes et à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Les anthocyanidines sont les structures basiques des anthocyanes. Leur structure comprend deux cycles benzéniques reliés par un

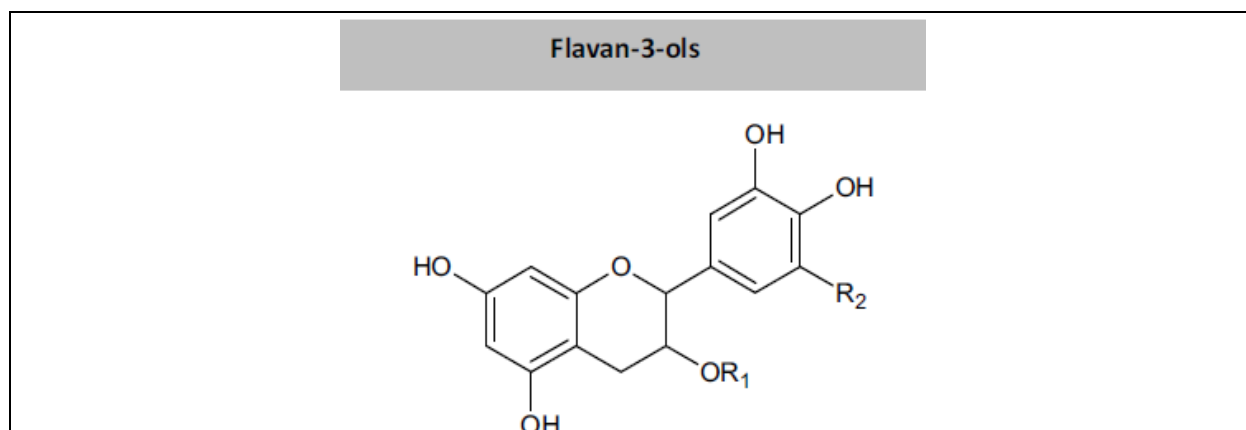
hétérocycle oxygéné et cationique (**Figure H16**). L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment donc ce sont les anthocyanes libres, sans oses accrochés. Dans le raisin et le vin, on distingue cinq anthocyanidines: la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).



**Figure H16 : Le squelette des anthocyanidines (Costa *et al.*, 2012)**

#### 4.2.2.2 Les flavanols ou les flavan-3-ol

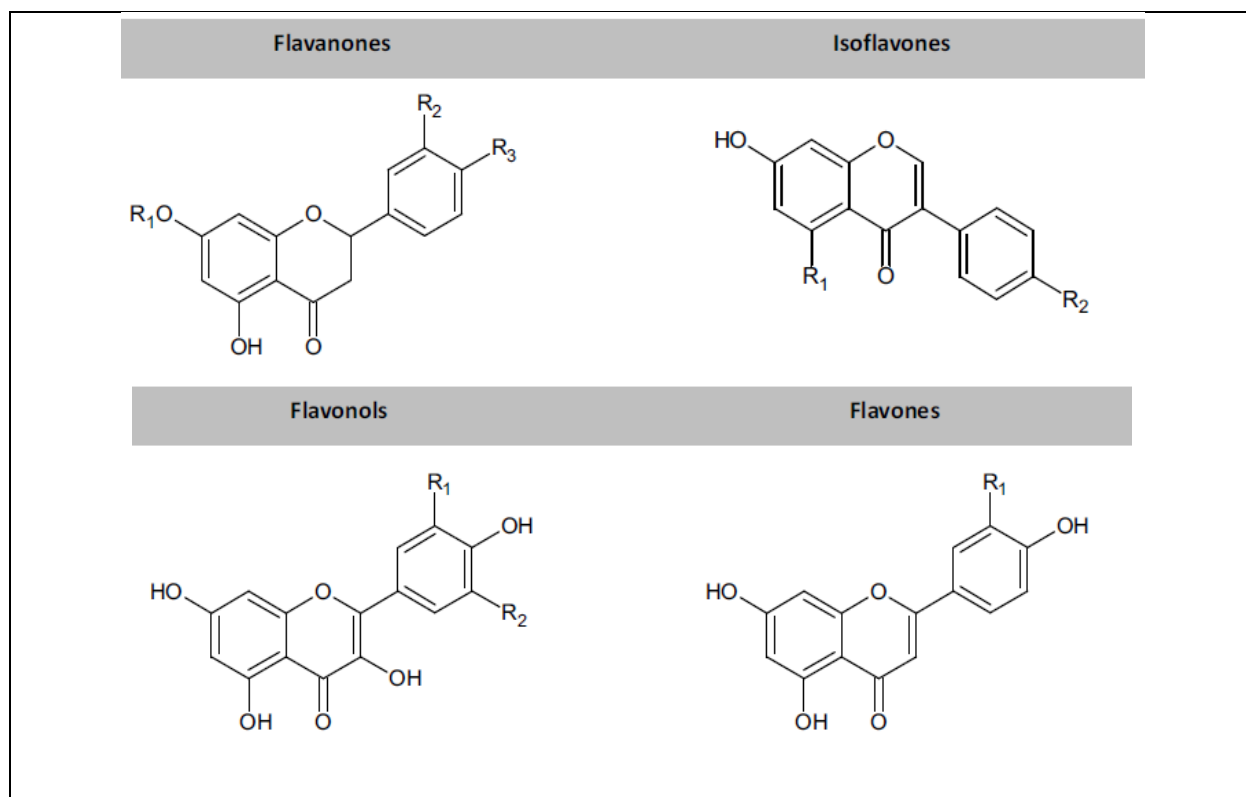
Ils existent en 2 formes : monomères (ex. catéchine) et oligomères (ex. proanthocyanidine). Contrairement à d'autres classes de flavonoïdes, les flavanols ne sont pas glycosylés dans les aliments. La catéchine et l'epicatéchine sont les flavanols principaux des fruits alors que la gallocatéchine, l'epigallocatéchine et epigallocatéchine gallate se trouvent dans certaines graines de légumineuses, dans le thé et dans les raisins. Les proanthocyanidines, également connus sous le nom de tanins condensés, sont des dimères, oligomères et polymères de catéchines qui sont reliés entre eux par des liaisons entre C<sub>4</sub> et C<sub>8</sub> (ou C<sub>6</sub>) (**Figure H17**).



**Figure H17 : Le squelette des flavan-3-ols (Costa *et al.*, 2012)**

#### 4.2.2.3 Les flavonols, flavones, flavanones et isoflavones

- Les flavonols : Ce sont les flavonoïdes les plus présents dans les aliments et souvent ils se trouvent sous forme glycosylée (**Figure H18**). Vu que leur biosynthèse est stimulée par la lumière du soleil, ces composés se trouvent principalement dans les feuilles et la peau du fruit et leurs concentrations varient entre des fruits présents sur un même arbre et entre différents côtés d'un même fruit.
- Les flavones : Ils sont beaucoup moins fréquents que les flavonols dans les fruits et les légumes. Ils consistent principalement en glycosides de lutéoline et d'apigénine.
- Les flavanones : Ils sont généralement glycosylés par un disaccharide à la position 7 : soit un néohesperidose qui confère un goût amer, soit un rutin qui est sans goût.
- Les isoflavones : Ils sont des flavonoïdes ayant des similitudes structurales avec les œstrogènes. Classés parmi les phyto-œstrogènes, ces molécules se trouvent presque exclusivement dans les légumineuses (Manach *et al.*, 2004; Cheynier *et al.*, 2013).



**Figure H18 : Les squelettes des flavanones, isoflavones, flavonols et flavones (Costa *et al.*, 2012)**

### 4.3 Les composés phénoliques : des antioxydants exogènes

Les publications concernant les propriétés biologiques des composés phénoliques sont de plus en plus nombreuses (Rasines-Perea and Teissedre, 2017). Ce sont des molécules actives, dotées d'un fort pouvoir antioxydant, leur conférant des propriétés physiologiques bénéfiques.

#### Des éléments de lutte contre l'oxydation

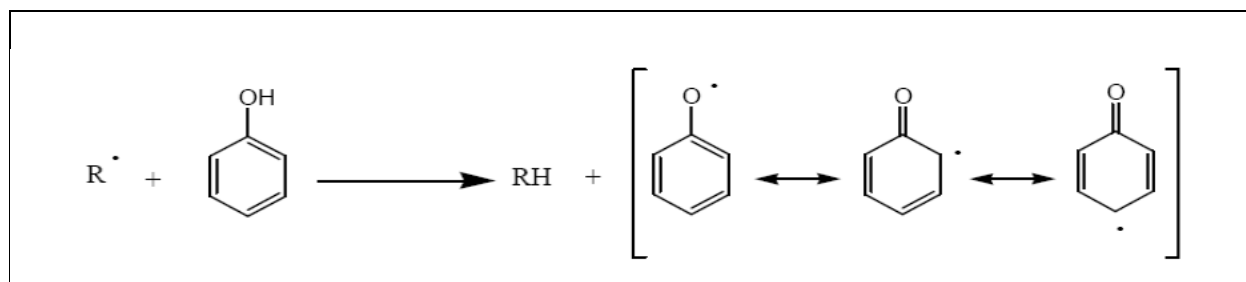
L'oxydation est un phénomène déclenché par les radicaux libres, des espèces chimiques instables, neutres ou chargées, possédant un électron non apparié. Cette instabilité leur procure une grande réactivité vis-à-vis des constituants organiques et des structures cellulaires environnantes ; les radicaux libres attaquent l'ADN, les lipides et les protéines, induisant des dégâts et la mort cellulaire. Ces espèces sont générées en permanence par des facteurs endogènes tels que le métabolisme physiologique normal (respiration...) et les réponses inflammatoires de notre organisme. Par ailleurs, elles sont produites par des facteurs exogènes comme l'irradiation

et les contaminants. Un excès de réactions d'oxydation est impliqué dans plusieurs maladies, comme par exemple les maladies coronariennes, le cancer et les maladies neurodégénératives. Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO). On peut citer à titre d'exemple : le radical hydroxyle ( $\text{HO}\cdot$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), l'oxyde nitrique ( $\text{NO}\cdot$ ), les enzymes oxydantes (lipoxygénase, peroxydase), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques (Min and Ebeler, 2008).

En quantité contrôlée, les radicaux libres jouent un rôle important de messenger et régulateur cellulaire. Tant qu'il a un équilibre entre la production des ERO et les mécanismes de défense intracellulaires (enzymes cellulaires anti-oxydantes dont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et glutathion peroxydase) associés à des antioxydants exogènes diététiques (Vitamines E et C, caroténoïdes et flavonoïdes), il n'y a pas de risque de stress oxydatif majeur.

En revanche, la perturbation de l'homéostasie entre les oxydants et les antioxydants conduit à un stress oxydatif qui provoque des changements dans les voies de signalisation intracellulaires et favorise la pathogenèse de plusieurs maladies, notamment cardiovasculaires (Moris *et al.*, 2017).

La recherche incessante de nouveaux agents pharmacologiques démontrant une action antioxydante et antiradicalaire a mis la lumière sur les CP qui sont parmi les meilleurs antioxydants exogènes et qui ont la propriété de contrecarrer les stress oxydatifs (Bouayed and Bohn, 2010). A cause de la mobilité de leur hydrogène phénolique, les CP sont capables de piéger les ERO. La perte d'un hydrogène engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie et c'est cette réactivité chimique qui confère aux CP leur caractère antioxydant (**Figure H19**).



**Figure H19 : Stabilisation du radical phénolique par mésomérie**

Les CP peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singulet, ou en chélatant les métaux de transition qui accélèrent fortement l'auto-oxydation des lipides.

De nombreuses études ont suggéré également que le rôle des CP en tant qu'antioxydants naturels, permet de prévenir des maladies inflammatoires induites par l'activation de la phospholipase A2 (PLA2). Quand la PLA2 est activée (par stimulation de TNF- $\alpha$ ), les CP inhibent les enzymes oxydantes, la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la lipoxigénase (LPO), de métaboliser l'acide arachidonique respectivement en prostaglandines et leucotriènes, des médiateurs de l'inflammation (Dzialo *et al.*, 2016).

#### 4.4 Métabolisme des composés phénoliques

L'activité antioxydante des CP a poussé les chercheurs à essayer d'établir un lien entre l'effet produit et la biodisponibilité de ces composés, c'est-à-dire la proportion qui va effectivement agir dans l'organisme par rapport à la quantité absorbée (Dutra *et al.*, 2017). L'activité biologique des métabolites produits se trouvant dans le sang ou dans des organes cibles diffère de celle des précurseurs initiaux de la matrice ingérée. La majorité des CP présents dans les plantes se trouve conjuguée à des sucres ou à d'autres polyols via des liaisons O-glycosidiques (flavonols, anthocyanidines et acides hydroxycinnamiques) ou via des liaisons esters (acides hydroxycinnamiques), et ne peut donc être absorbée sous sa forme native (Maatta-Riihinen *et al.*, 2004). Cependant, les CP subissent une catalyse (hydrolyse des glycosides et dégradation de l'aglycone en acides phénols simples) par les enzymes intestinales ou par la microflore du colon avant absorption.

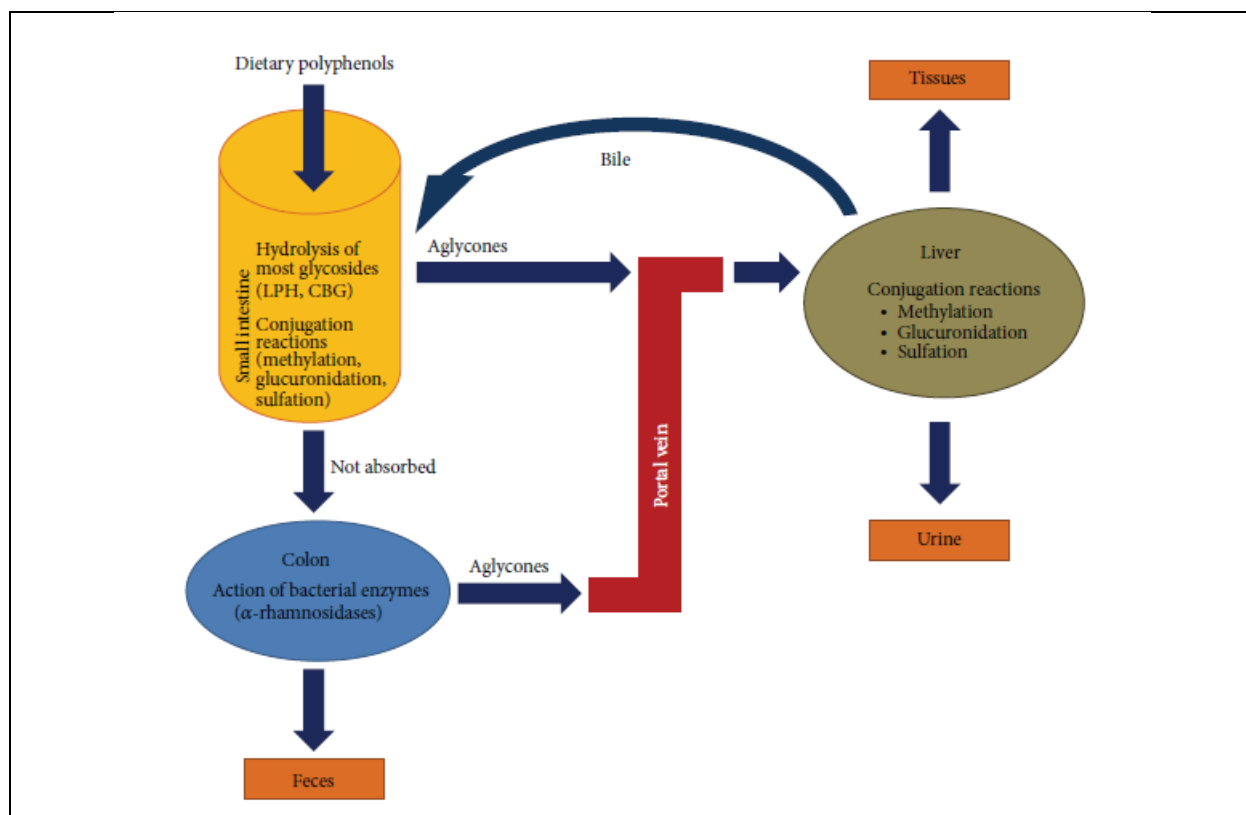
Cette étape pourrait être décisive pour l'action biologique des métabolites produits. Avant leur passage dans la circulation systémique, les CP qui sont maintenant sous forme d'aglycones vont encore voir leur structure modifiée par les processus de conjugaisons qui prennent place à la fois dans l'intestin grêle mais aussi et surtout dans le foie. Ce processus comprend principalement la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation (Pimpao *et al.*, 2013).

Les métabolites des CP peuvent suivre deux voies d'excrétion, par voie biliaire ou urinaire. Les métabolites hautement conjugués sont plus susceptibles d'être éliminés via la voie biliaire



dans le duodénum, où ils sont soumis à l'action d'enzymes bactériennes telle que la  $\alpha$ -rhamnosidase favorisant leur réabsorption et par la suite leur présence prolongée dans le corps. En revanche, les métabolites faiblement conjugués tels que les mono-sulfatés sont préférentiellement excrétés dans les urines (Manach *et al.*, 2004) (**Figure H20**).

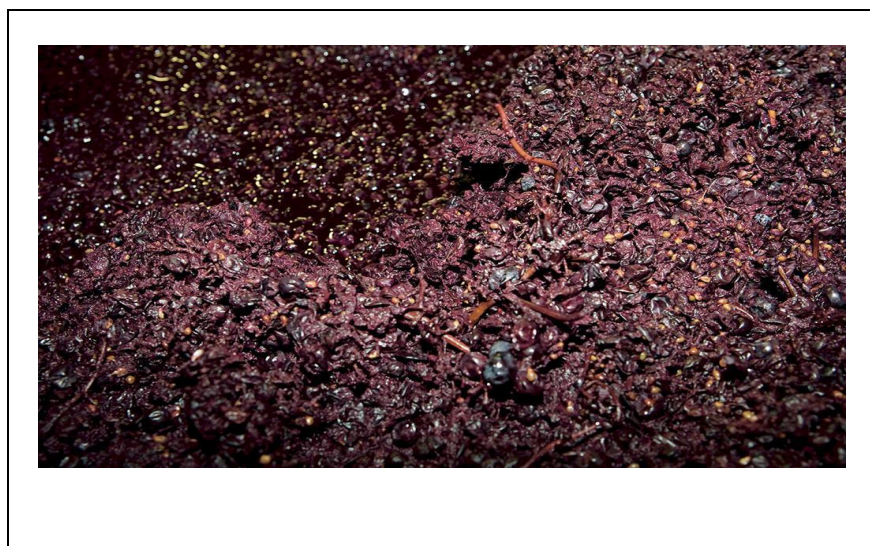
Le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, l'absorption intestinale, la cinétique plasmatique, la nature des métabolites circulants, l'absorption cellulaire, le métabolisme intracellulaire, l'accumulation dans les tissus et l'excrétion biliaire et urinaire sont tous des points clés du métabolisme des CP mais la difficulté consiste toujours à comprendre comment est établi le lien entre la totalité de ces variables et les effets bénéfiques des CP sur la santé.



**Figure H20** : Les voies d'absorption et de métabolisme des composés phénoliques. D'après (Marin *et al.*, 2015).

#### 4.5 Le marc de raisin

Le marc de raisin est le résidu de la presse lors du processus de vinification. Il est donc un sous-produit industriel très abondant qui représente 25 % de la masse totale du raisin (pellicule, pépins et rafles) (**Figure H21**).

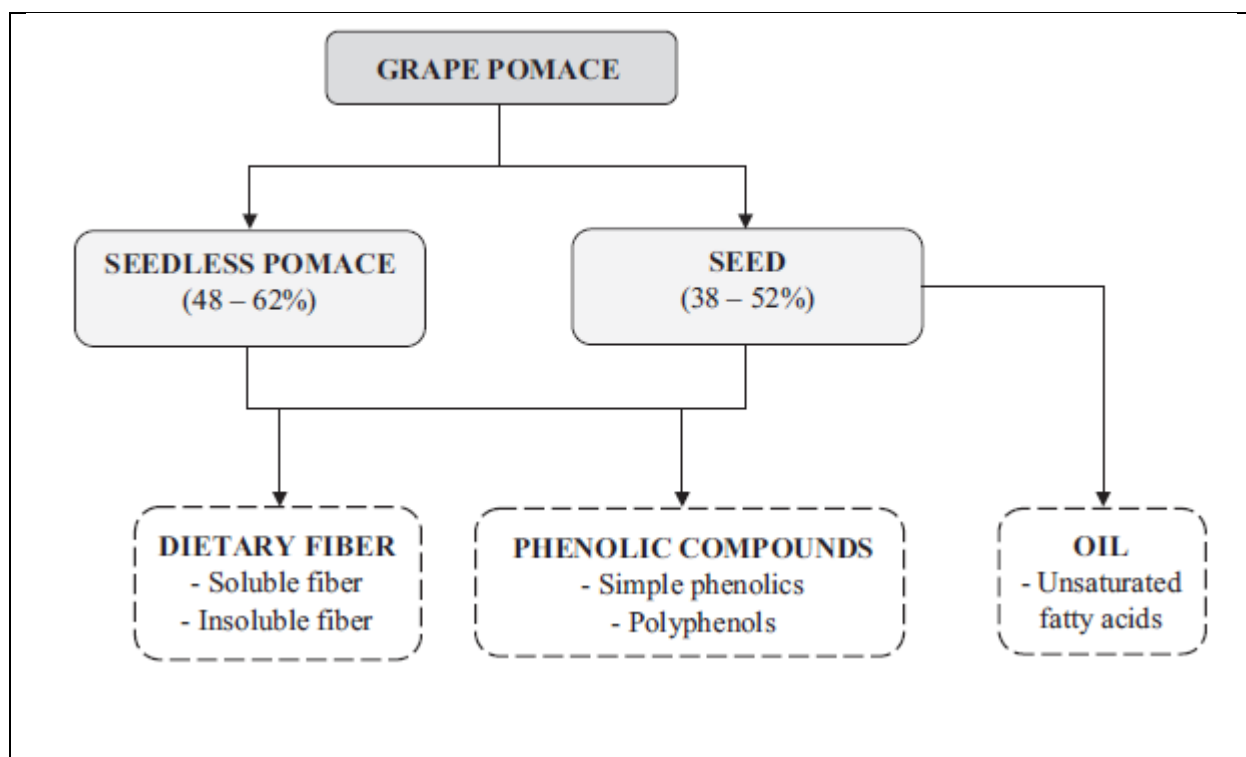


**Figure H21: Le marc de raisin issu du processus de vinification.**

Dans les pays où la production du vin est importante comme la France, l'Italie et l'Espagne, environ 1200 tonnes de marc sont produits par an (Beres *et al.*, 2017). Au fil des dernières années, le marc produit a été utilisé pour l'alimentation du bétail (Kafantaris *et al.*, 2017), il a servi de compost (Achmon *et al.*, 2016) et a été utilisé lors de la construction de bâtiments afin d'améliorer l'isolation thermique (Muñoz *et al.*, 2014). Malgré cela, de très grandes quantités de marc restent mal exploitées et mal valorisées et peuvent par conséquent nuire à l'environnement (pollution des eaux de surface et souterraines, odeurs fétides, attraction des mouches et des organismes nuisibles et appauvrissement de l'oxygène dans les sols et les eaux souterraines à cause des tannins et d'autres composés) (Christ and Burritt, 2013). De nos jours, la valorisation du marc de raisin reste un sujet d'intérêt majeur pour les industriels et les consommateurs.

#### 4.5.1 Composition

Le marc est constitué de pellicule, rafles et pépins de raisin. Tous ses éléments sont riches en composés bioactifs tels que les CP (flavanols, flavonols, stilbènes, acides phénoliques et les anthocyanes) et en fibres (Garcia-Lomillo and Gonzalez-SanJose, 2016). Les pépins représentent en moyenne 38 à 52 % du mélange de marc, et sont principalement appréciés pour leur teneur élevée en acides gras insaturés (oléique et linoléique) (**Figure H22**).



**Figure H22 : La composition du marc de raisin (Beres *et al.*, 2017)**

#### 4.5.2 Applications

Les extraits du marc de raisin peuvent être utilisés comme ingrédients fonctionnels ayant une forte teneur en fibres et CP (Zhang *et al.*, 2017), dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques ayant le pouvoir d'inhiber les enzymes protéolytiques telles que la collagénase et l'élastase responsables du vieillissement cutané (Panzella and Napolitano, 2017). Ils peuvent également servir de matière première de bioconversion afin de produire des biocarburants, de la chaleur et de l'énergie (Zacharof, 2017).

### 4.5.3 Extraction des composées phénoliques à partir du marc de raisin

Vu la composition riche du marc de raisin en CP, une grande importance est accordée à la valorisation de ses composés d'intérêt. Parmi les nombreuses nouvelles techniques d'extraction des CP du marc développées ces dernières années afin d'augmenter le rendement en CP (Maroun *et al.*, 2017; Maroun *et al.*, 2018), l'extraction solide-liquide couplée à une agitation mécanique, reste la technique la plus répandue (Schieber, 2016).

La variabilité des CP et le rendement de l'extraction dépendent en premier lieu de facteurs qui sont liés à la récolte tels que le cépage, l'emplacement géographique, le climat, la condition du sol et le processus technologique. Participent également à la qualité de cette extraction, des paramètres tels que le type du solvant, la taille des composants, la température et le temps (Ignat *et al.*, 2011). Le taux d'extraction des CP est également influencé par la taille de la matière première. Un broyage de cette dernière améliore le transfert de matière en augmentant la surface de contact entre le solvant et le solide (Bonilla *et al.*, 1999).

## 5 Composés phénoliques et système cardio-vasculaire

Une variété d'études couvrant des essais cliniques, des données épidémiologiques aussi bien que des études *in vitro* et *in vivo* ont été conduites d'une part pour établir un lien de cause à effet entre une diète riche en CP et l'amélioration de la santé, et d'autre part pour mieux comprendre les mécanismes de protection notamment cardiovasculaires conférés par ces composés.

Historiquement, les effets cardioprotecteurs des CP ont été attribués principalement à leur pouvoir de modulation des mécanismes de défense antioxydants cellulaires. Les CP agissent en favorisant la synthèse des enzymes antioxydantes comme la SOD, la catalase, le glutathion S-transférase (GST) et le glutathion peroxydase (GPx). Au fil du temps, différentes équipes de recherche ont démontré que les CP peuvent également moduler l'expression de certains gènes et certaines voies de signalisation intracellulaires dans le myocarde (Khurana *et al.*, 2013). Ces derniers semblent activer les voies qui augmentent les enzymes antioxydantes (FOXO, AMPK, Nrf2) et en même temps réprimer les voies pro-inflammatoires, pro-fibrotiques et pro-apoptotiques (NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt, TGF- $\beta$ /Smad, ERK 1/2) (Dai 2012). Le processus d'activation ou d'inhibition des voies de signalisation du myocarde par les CP est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

L'action anti-oxydante et bénéfique des CP sur le système cardiovasculaire pourrait résulter d'une vasodilatation, d'un effet anti-thrombotique, anti-inflammatoire, anti-apoptotique, hypolipémiant et anti-athérogène. Les effets vasodilatateur, anti-inflammatoire et antiathérogène sont décrits ci-dessous.

### 5.1 CP et effet vasodilatateur

On parle d'homéostasie vasculaire stable, au moment où la production et la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) sont équitables. Le NO est une molécule cardioprotectrice endogène qui joue un rôle fondamental dans la régulation du tonus vasculaire. Sa biodisponibilité est réduite en présence des radicaux libres. Des études faites sur les anneaux de l'aorte et des artères mésentériques de rat ont révélé que les CP du vin rouge peuvent induire une relaxation dépendante de l'endothélium. En effet, les CP du vin rouge sont capables d'induire l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) par deux mécanismes (**Figure H23**) (Zenebe *et al.*, 2003; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006). Certains CP comme la delphinidine, une anthocyanine présente dans le vin rouge, déclenche l'activation d'eNOS par le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline. Dans les cellules

endothéliales au repos, l'eNOS est couplée à une protéine structurale : la calvéoline. La delphinidine est capable d'induire une augmentation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  libre favorisant la dissociation du complexe eNOS/calvéoline. Ainsi l'eNOS s'active en se liant au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline aboutissant à la formation du NO. Alors que d'autres CP font intervenir la voie phosphoinositide-3 kinase (PI3-Kinase)/AKT, aboutissant à la phosphorylation d'eNOS, ce qui déclenche la libération de NO.

Les CP du vin rouge peuvent donc induire des relaxations dépendantes de l'endothélium médiées par la libération de NO, et impliquant principalement le GMP cyclique (GMPc) provenant de l'hydrolyse du GTP par la guanylyl cyclase soluble (GCs) dans les cellules musculaires lisses (chataigneau 2003).

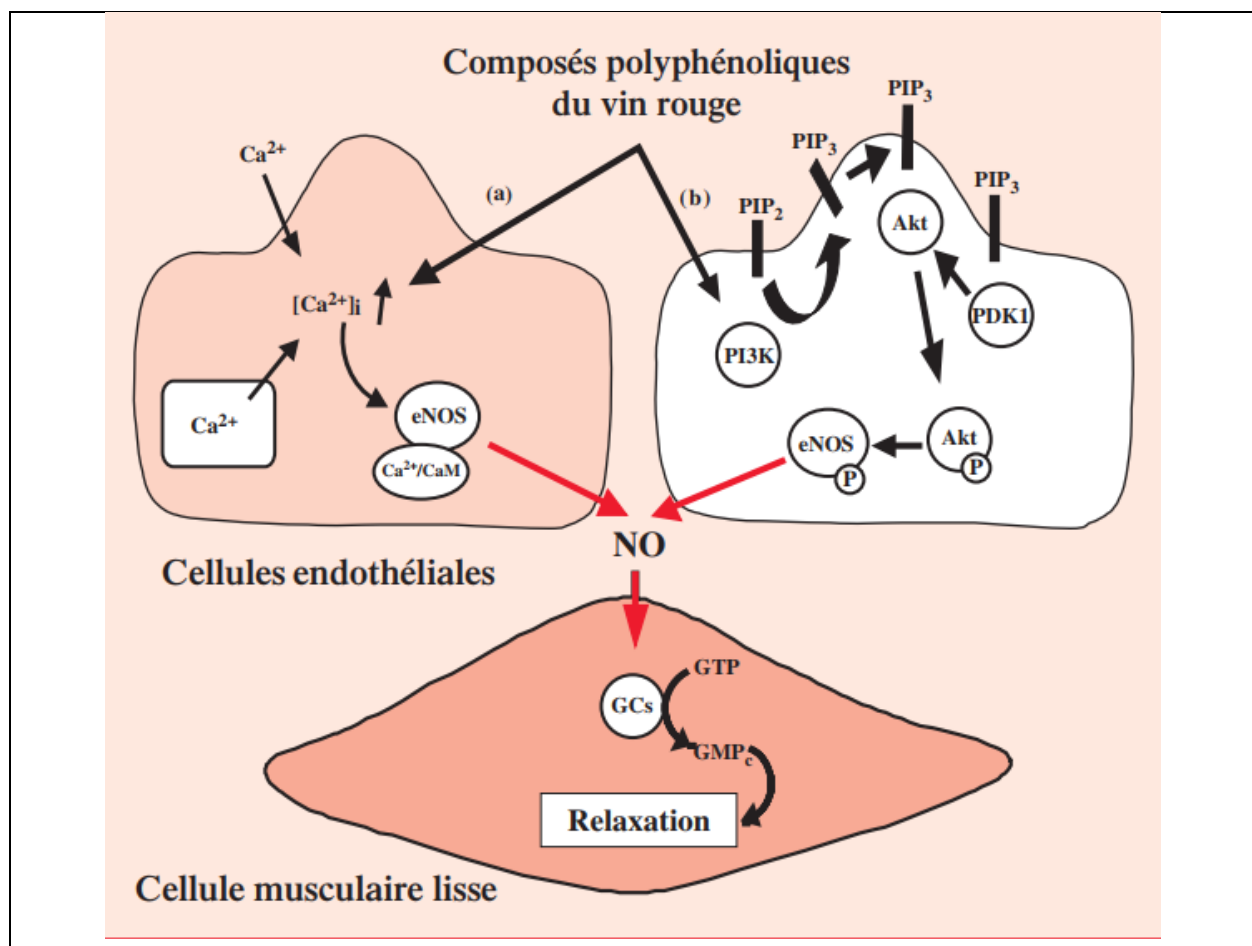


Figure H23 : Les deux mécanismes par lesquels les composés phénoliques stimulent la formation endothéliale de NO dans les artères (Chataigneau *et al.*, 2003).

## 5.2 CP et effet anti-inflammatoire

Un important processus inflammatoire prend place durant les maladies cardiovasculaires. Le stress oxydatif favorise l'augmentation des enzymes oxydantes telles que la COX et la LPO qui sont impliquées dans la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que les chimiokines, les cytokines, les leucotriènes et les thromboxanes (Quinones *et al.*, 2013). Il a été démontré que les CP, plus particulièrement la quercétine et le RVT, inhibent l'activité des enzymes COX-1 et COX-2 (Crescente *et al.*, 2009).

En réponse à divers stimuli inflammatoires ( tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et la CRP), les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans le recrutement des leucocytes, à travers l'expression de molécules d'adhésion spécifiques (vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) et intracellular adhesion molecule I (ICAM-1) (Tangney and Rasmussen, 2013). Il a été démontré que le RVT réduit la surexpression de ces molécules d'adhésion par inhibition de la voie facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dans les cellules endothéliales et modère donc la réaction inflammatoire (Deng *et al.*, 2011).

Le NF- $\kappa$ B est probablement la cible moléculaire majeure pour les effets anti-inflammatoires observés des CP dans le système vasculaire. Cette protéine peut réguler le processus inflammatoire en modulant l'expression des gènes pro-inflammatoires. Plusieurs CP ont été décrits comme inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B, ayant la capacité de moduler un point moléculaire en amont de la cascade de signalisation, affectant ainsi toutes les étapes suivantes (**Figure H24**). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B requiert la phosphorylation d'IKK (la protéine kinase d'I $\kappa$ B). La quercétine, le Kaempferol, l'EGCG, la catéchine et l'épicatéchine sont capables de réduire l'activité d'IKK (Aneja *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Normalement, une fois IKK est activée, cette kinase phosphoryle à son tour I $\kappa$ B qui est ensuite ciblé à être dégradé par le protéasome. Le RVT est parmi plusieurs CP qui empêchent la dégradation d'I $\kappa$ B et préviennent par la suite l'activation de NF-  $\kappa$ B (Ma *et al.*, 2015).

La phosphorylation de p65 et sa translocation vers le noyau est aussi un point majeur dans l'activation de la voie NF-  $\kappa$ B. Des CP tels que l'acide caféique, l'apigénine et la quercétine inhibent la phosphorylation de p65 (Choi *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2009). La catéchine et l'épicatéchine, deux autres CP, inhibent également la translocation de la protéine p50 qui fait partie de la famille NF-  $\kappa$ B (Mackenzie *et al.*, 2004).

Certaines études ont démontré que les CP peuvent inhiber aussi l'activation de MAPK (en particulier ERK 1/2) et par conséquent inhiber la stimulation de l'activité de NF- $\kappa$ B et l'expression de l'iNOS. L'inhibition de l'activation d'ERK1/2 a été rapportée au cyanidine-3-O-glucoside et à la quercétine. (Pergola *et al.*, 2006).

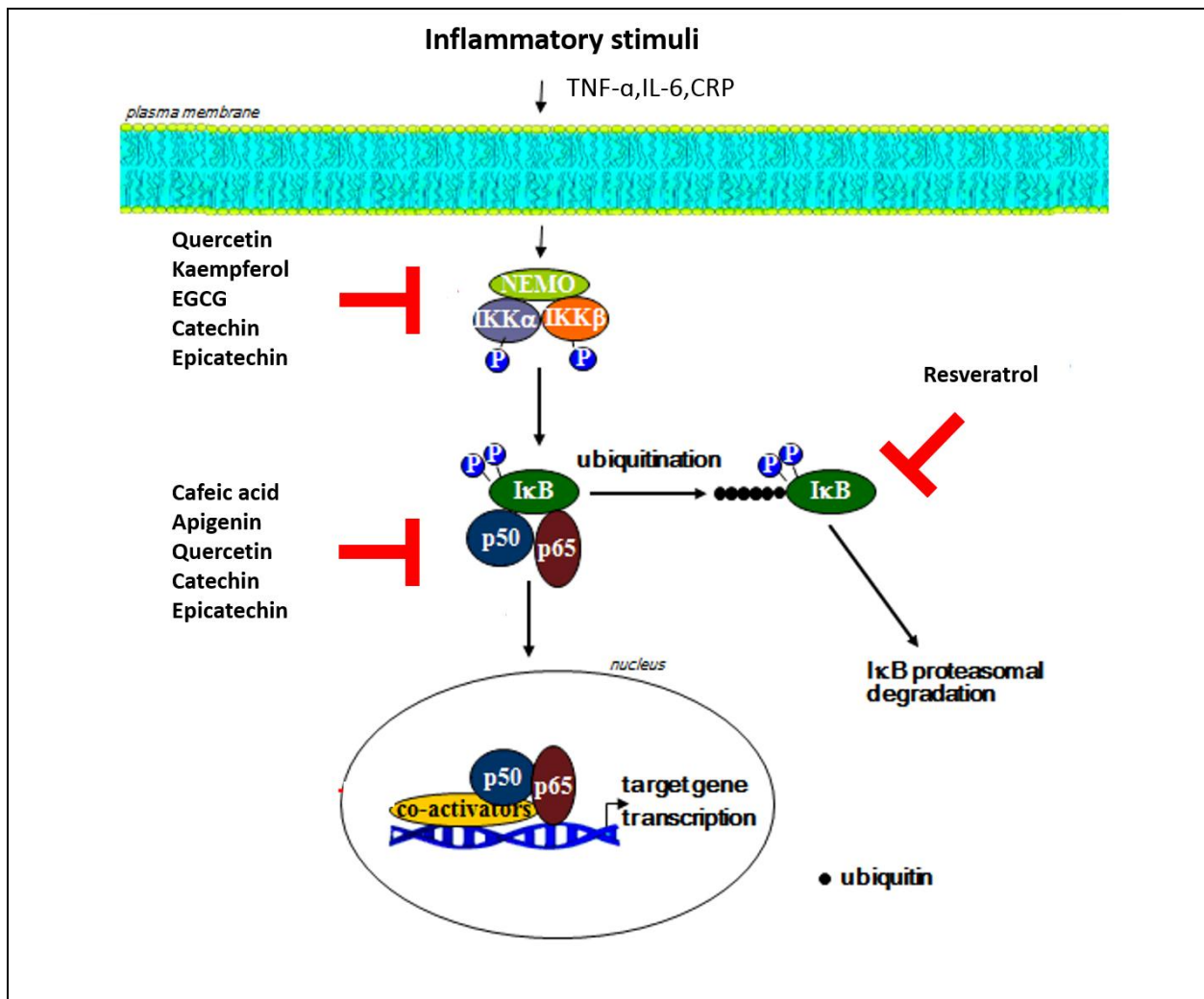


Figure H24: Modulation des CP de la cascade de signalisation de NF- $\kappa$ B.



### 5.3 CP et effet anti-athérogène

Un des effets bénéfiques les plus fréquemment étudiés des CP est leur capacité d'améliorer le profil lipidique par inhibition d'accumulation de lipides dans la paroi artérielle et par la suite l'obstruction des artères. Quand le cholestérol sanguin transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL) rentre dans la paroi du vaisseau sanguin, il est oxydé. Ainsi, le vaisseau va réagir et les cellules endothéliales vont faire appel aux monocytes qui vont se transformer en macrophages. Les macrophages vont attaquer le LDL oxydé ce qui aboutit à la formation de cellules spumeuses (mousseuses). Devant cette agression du vaisseau sanguin, l'endothélium va réagir et va augmenter les cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ), les chimiokines et augmenter les facteurs de croissance ce qui va attirer les monocytes qui vont s'adhérer aux cellules endothéliales. Les CP agissent en inhibant la sécrétion des molécules d'adhésion, l'entrée du LDL dans la paroi du vaisseau sanguin et en stimulant l'efflux du cholestérol à partir des macrophages transformés en cellules spumeuses (Aviram *et al.*, 2000; Scalbert *et al.*, 2005).

### 5.4 CP et hypertrophie cardiaque

De nombreux antioxydants ont montré *in vivo* et *in vitro* des effets inhibiteurs de l'hypertrophie cardiaque induite par les ERO. Les effets protecteurs de l'EGCG sur l'hypertrophie ont été corrélés avec l'amélioration du stress oxydatif induit par la surcharge de pression. D'autre part, il a été suggéré que le mécanisme de prévention de l'hypertrophie cardiaque par les flavonoïdes est dû principalement à la prévention de l'apoptose des CMs (Sheng *et al.*, 2007).

En hypertrophie cardiaque, le rôle de SERCA est affecté et par conséquent la concentration cytosolique du  $\text{Ca}^{2+}$  augmente, induisant des lésions tissulaires, une apoptose et des troubles de la contraction cardiaque. Certains flavonoïdes augmentent significativement la viabilité des CMs grâce à la préservation de la fonction SERCA qui va séquestrer normalement le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique permettant la relaxation (Horakova, 2011).

## 6 Le rein

### 6.1 Introduction

La fonction rénale est non seulement vitale chez les mammifères mais aussi formidablement complexe. L'objet de cette introduction nécessairement basique est d'en présenter rapidement quelques-uns des aspects fondamentaux avant d'aborder le concept de vieillissement de cet organe.

Les reins sont des organes rétropéritonéaux, situés derrière le péritoine sur la paroi postérieure de l'abdomen de chaque côté de la colonne vertébrale, au niveau de la douzième côte. Le rein droit est situé à environ 1 à 2 cm plus bas que le rein gauche dû à la présence du foie (Klatte *et al.*, 2015).

Le néphron est l'unité structurelle et fonctionnelle du rein. Chez l'homme adulte, chaque rein contient environ un million de néphrons. Chez le rat, le rein est composé d'environ 30000 néphrons. Ceux-ci assurent trois fonctions vitales :

- La filtration glomérulaire du plasma des capillaires glomérulaires vers la lumière tubulaire
- La réabsorption du liquide tubulaire vers la lumière des capillaires périrubulaires
- La sécrétion tubulaire du plasma des capillaires périrubulaires vers la lumière tubulaire (Zhuo and Li, 2013).

Le rein est un organe indispensable à la survie de l'organisme. Il a de multiples fonctions ; il exerce un rôle de filtrage de sang et d'élimination des produits de dégradation du métabolisme cellulaire. Il permet de maintenir l'osmolarité du fluide corporel ainsi que les concentrations des électrolytes. Le rein régule également la pression artérielle, la volémie et l'équilibre acido-basique. Il est responsable de la filtration glomérulaire et des fonctions tubulaires (réabsorptions et sécrétions). Le rein synthétise également plusieurs hormones telles que l'érythropoïétine (Epo), le calcitriol et la rénine (Starling, 1899).

En clinique, le débit de filtration glomérulaire (DFG) est le meilleur indice permettant d'évaluer la fonction rénale globale (Ferguson and Waikar, 2012). Le DFG correspond au volume du filtrat de l'ensemble des glomérules par unité de temps. En 2002, la 'National Kidney Foundation' a publié les recommandations internationales pour définir et pour classer l'insuffisance rénale chronique (IRC). Dans les conditions physiologiques normales, le DFG est de 120 mL/min. Plus le DFG est réduit, plus l'IRC est en stade avancé (**Tableau H1**).

**Tableau H1 : Classification internationale de l'insuffisance rénale chronique (NKF N/DOQI, 2002)**

Stade	Description	DFG mL/min/1.73m <sup>2</sup>
I	Maladie rénale chronique avec fonction rénale normale	≥ 90
II	Insuffisance rénale légère	60-90
III	Insuffisance rénale modérée	30-59
IV	Insuffisance rénale sévère	15-29
V	Insuffisance rénale terminale	< 15

## 6.2 Vieillessement du rein

Le vieillissement est souvent associé à une détérioration structurelle et fonctionnelle progressive du rein. Les changements structurels les plus souvent décrits chez les sujets âgés sont une masse rénale réduite progressivement avec l'âge et un pourcentage élevé de scléroses glomérulaires et de fibroses interstitiels tubulaires (Yoon and Choi, 2014). Ces derniers sont accompagnés par des altérations fonctionnelles telles que la réduction du flux sanguin rénal, la diminution de la filtration glomérulaire et la limitation du contrôle du métabolisme du sel et de l'eau (Rainfray *et al.*, 2000).

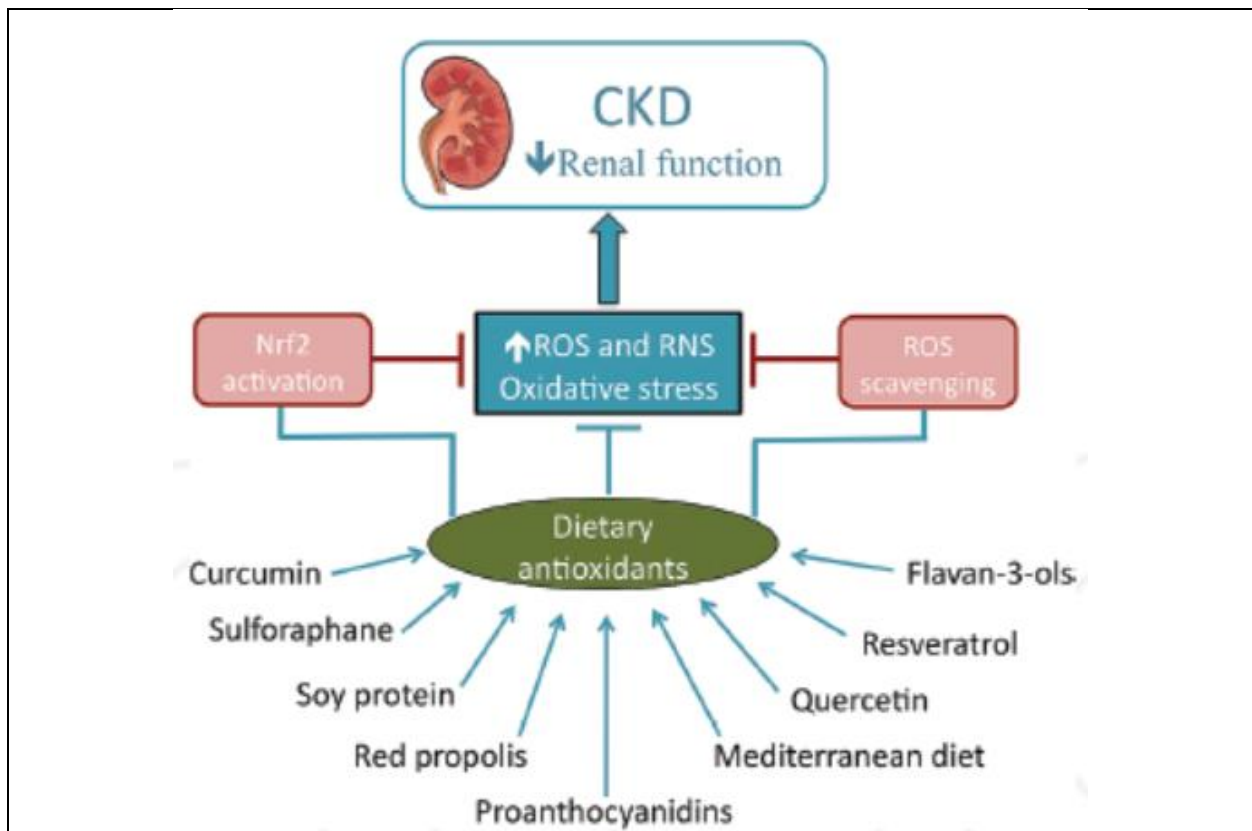
Une étude visant à suivre le changement histologique, le stress oxydatif et l'expression des protéines liées au vieillissement du rein

entre souris jeunes et souris âgées de 24 mois a révélé une albuminurie significativement plus élevée avec l'âge, une fibrose tubulo-interstitielle significativement élevée et une expression réduite de SOD 1, SOD 2 et de SIRT 1 (Lim *et al.*, 2012).

Des études épidémiologiques suggèrent que la perte de la fonction rénale âge-dépendante est associée à une hypertension systémique, au tabagisme, à la dyslipidémie, à l'athérosclérose, à la présence de marqueurs inflammatoires, à l'obésité et au sexe masculin (Weinstein and Anderson, 2010).

### 6.3 Rein et antioxydants alimentaires

Le stress oxydatif joue un rôle critique dans la progression de l'IRC. Il agit d'une manière directe en induisant des lésions glomérulaires et tubulaires, ou d'une manière indirecte via l'inflammation, l'hypertension et/ou la dysfonction endothéliale. Les antioxydants alimentaires ont montré des effets protecteurs contre la maladie rénale chronique (**Figure H25**) et (**Tableau H2**).



**Figure H25 : Les propriétés bénéfiques des antioxydants alimentaires et leur rôle dans la maladie rénale chronique (Eugenio-Perez *et al.*, 2016).**

Ces effets néphroprotecteurs passent, principalement, par l'activation du facteur de transcription Nrf2 ; facteur de transcription des enzymes antioxydantes.

**Tableau H2 : Effets protecteurs de certains antioxydants diététiques contre la maladie rénale chronique**

Composé / Modèle	Effet observé	Référence
Curcumin / Rat néphrectomisé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Régression de l'hypertension glomérulaire et de l'hyperfiltration.</li> <li>• Activation de Nrf2</li> <li>• Prévention de la réduction de l'activité des enzymes antioxydantes (Catalase, glutathion réductase, glutathion peroxydase et glutathion S-transférase)</li> <li>• Réduction de l'hypertension systémique et glomérulaire, de la sclérose glomérulaire, de la fibrose et l'inflammation interstitielle.</li> </ul>	<p>(Tapia <i>et al.</i>, 2013)</p> <p>(Tapia <i>et al.</i>, 2012)</p>
Quercétine / Rat diabétique induit par la streptozotocine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduction de la protéinurie, de la créatinine sérique et de l'urée sanguine.</li> <li>• Réduction de la polyurie et de la glycémie.</li> <li>• Normalisation de l'index de glomérulosclérose et du rapport masse du rein/masse du corps.</li> </ul>	<p>(Anjaneyulu and Chopra, 2004)</p> <p>(Gomes <i>et al.</i>, 2015)</p>
Flavan-3-ols / Rat avec maladie rénale chronique induite par l'adénine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de la production de la méthylguanidine, une toxine urémique.</li> </ul>	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2004)

## 7 Le microbiote

### 7.1 Introduction

De nouvelles découvertes en microbiologie et en recherche clinique ont révélé l'importance du microbiote intestinal sur la santé de l'hôte (Saint-Georges-Chaumet and Edeas, 2016). Le microbiote intestinal est composé de 1000 espèces différentes et principalement constitué par deux phylums bactériens majeurs : les Firmicutes et les Bacteroidetes. Parmi les phylums les moins dominants, on distingue les Actinobactéries, les Fusobactéries et les Verrucomicrobia (Jandhyala *et al.*, 2015).

En fonction des espèces, les bactéries du microbiote intestinal sont considérées comme bénéfiques ou pathogènes. A titre d'exemple, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Elles améliorent la fonction de la barrière intestinale, stimulent le système immunitaire, préviennent des diarrhées, contribuent à l'activation des provitamines et modulent le métabolisme des lipides (Arboleya *et al.*, 2016). En revanche, d'autres espèces bactériennes telles que *Clostridium (Cluster I)* qui est un constituant physiologique de la microflore, peuvent devenir responsables de sérieuses infections et maladies inflammatoires de l'intestin si leur population est excessive (Lakshminarayanan *et al.*, 2013; Ozdal *et al.*, 2016).

Un microbiote sain et équilibré participe à la fonction digestive intestinale et à l'approvisionnement d'importants nutriments indispensables à la croissance et au bien-être (Jandhyala *et al.*, 2015). Des mécanismes multifactoriels régulent la qualité et la diversité du microbiote y compris le régime alimentaire, le stress, la prise de médicaments notamment antibiotiques, les problèmes de santé généraux et l'âge (Kumar *et al.*, 2016).

### 7.2 Microbiote et âge

Le vieillissement dérégule la composition du microbiote (Kumar *et al.*, 2016). Avec l'âge, le déclin du fonctionnement du système immunitaire et la modification de la physiologie intestinale (troubles de la motilité gastrique, hypochlorhydrie, changements dégénératifs du système nerveux entérique) sont parmi les facteurs responsables des altérations du microbiote (Vaiserman *et al.*, 2017). Ces changements incluent une réduction de la diversité des espèces, une moindre abondance des micro-organismes bénéfiques et une augmentation des bactéries pathogènes

(Salazar *et al.*, 2014). En contrepartie, la perturbation du microbiote intestinal âge-dépendante se révèle être un facteur déterminant de plusieurs pathologies associées à l'âge telles que les maladies neurodégénératives (Friedland, 2015), l'inflammation chronique (Rehman, 2012), l'asthénie (Meehan *et al.*, 2015), le diabète type 1 et 2 (Paun and Danska, 2016) ainsi que la stéatose hépatique non alcoolique et les maladies cardiovasculaires (Sanduzzi Zamparelli *et al.*, 2016).

### 7.3 Microbiote et composés phénoliques

Dans le paragraphe 4.4, nous avons détaillé le métabolisme des composés phénoliques (CP) et plus particulièrement la biotransformation de ces composés par le microbiote en leurs métabolites. Dans cette partie nous abordons l'impact de la consommation des CP sur la composition du microbiote intestinal. L'effet de plusieurs aliments riches en CP et/ou de certains CP unitaires ont été explorés sur le microbiote dans plusieurs études au cours des dernières années (Etxeberria *et al.*, 2013). A titre d'exemple, une dose de 50 mg/Kg de CP administrée à des rats pendant 15 semaines a révélé une quantité plus abondante de *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans leurs selles comparées aux contrôles. Alors que *Clostridium* et *Propionibacterium* prédominaient dans les fèces des rats non traités (Dolara *et al.*, 2005). Tous les CP n'ont pas le même effet sur la modulation de l'abondance relative de *Lactobacillus*. L'effet observé suite à l'administration d'un mélange dépend de sa composition et de l'effet synergique de ses constituants. L'acide gallique, les proanthocyanidines et le resveratrol ont augmenté l'abondance de *Lactobacillus* alors que (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et quercétine n'ont pas montré de variation significative (Ozidal *et al.*, 2016). Les effets antimicrobiens du RVT contre plusieurs agents pathogènes ont été signalés dans une autre étude. L'administration du RVT à un modèle de rat ayant une colite a démontré après 20 jours une augmentation significative de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ainsi qu'une diminution des entérobactéries (Larrosa *et al.*, 2009).

### Position du problème

Une variété d'études couvrant des essais cliniques, des données épidémiologiques aussi bien que des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que les CP sont des molécules bioactives qui exercent des effets physiologiques divers, tels que : effets vasodilatateurs, antiathérogènes, antimicrobiens, anti-thrombotiques, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, anti-hypertensifs antiarthritiques et surtout des effets antioxydants.

Toutefois, l'intérêt physiologique *in vivo*, de ces molécules au cours d'un vieillissement naturel de l'organisme et sous forme de mélange au sein d'une matrice alimentaire, n'a pas été jusqu'à présent évalué. Par ailleurs, la biodisponibilité des CP est très dépendante de leur absorption intestinale et ils sont souvent ingérés en tant que précurseurs non absorbables qui sont transformés en des formes bioactives par des micro-organismes spécifiques dans l'intestin.

Les objectifs du présent travail visent donc à mieux comprendre dans quelle mesure et comment un mélange de CP incorporé à la diète alimentaire peut améliorer l'état physiologique d'un organisme au cours du vieillissement. Les systèmes cardiovasculaire et rénal ont été plus particulièrement étudiés dans un modèle de rat. Ce travail repose sur la mise en place d'un protocole expérimental incluant :

- une répartition des rats en 6 groupes, 4 groupes traités par différentes concentrations de CP (2.5 mg/Kg/j ; 5 mg/Kg/j, 10 mg/Kg/j, 20 mg/Kg/j) ; 1 groupe diméthyl sulfoxyde (DMSO) 0.16% et 1 groupe contrôle non traité. Le traitement est journalier et ce pour une durée de 14 mois.
- un suivi échocardiographique chaque 3 mois
- une étude anatomo-pathologique sur les tissus prélevés (cœur et rein) après 14 mois de traitement.
- des dosages plasmatiques des facteurs inflammatoires
- des dosages biochimiques des protéines impliquées dans les complications dues au vieillissement par la technique de Western Blot.
- une approche préliminaire électrophysiologique des effets des CP sur les fibroblastes cardiaques.
- une évaluation exhaustive de l'effet synergique et du profil métabolique des CP.



Parallèlement aux objectifs cités précédemment, l'effet à long terme des CP sur le microbiote intestinal a été étudié. Pour ce faire, nous avons :

- Identifier et quantifier par chromatographie liquide à haute performance les CP de la poudre
- Récolter les urines et excréments chaque 3 mois.
- Détecter par une UPLC couplée à une spectroscopie de masse des métabolites présents dans l'urine.
- Extraire l'ADN à partir des excréments.
- Comparer le profil du microbiote des rats traités vs. non traités par une analyse de l'ADN bactérien par qPCR afin de mettre en évidence des effets biologiques des CP sur le microbiote intestinal.

## II. Matériels et méthodes

### A. Caractérisation de la poudre

#### 1 Extraction des CP à partir du marc de raisin

Le marc de raisin multi-cépages (Cabernet sauvignon, Syrah et Merlot) est fourni par Château KSARA (vallée de la Bekaa, Liban) et stocké à -20 °C. Décongelés à température ambiante, les coproduits du vin sont broyés afin d'obtenir un mélange homogène. L'extraction des CP par solvant du marc de raisin est réalisée pendant 6h de temps à 70 °C en utilisant 70% éthanol/eau avec un ratio 1 : 2 (masse/volume) et sous agitation (Rajha *et al.*, 2014).

#### 2 Atomisation

##### 2.1 Principe

C'est une opération qui permet de produire une poudre à partir d'une solution. Le principe de base consiste à pulvériser un liquide dans une enceinte où règne une température supérieure à la température d'ébullition du solvant. Le procédé de séchage par atomisation comprend 3 étapes :

- Atomisation de la phase liquide par passage à travers une turbine centrifuge tournant à une très grande vitesse.
- Evaporation du liquide et la cristallisation du solide.
- Séparation de la poudre sèche formée de l'air humide au moyen du cyclone (**Figures MM1 et MM2**).

##### 2.2 Protocole

En premier lieu, il s'agit d'augmenter la pression du compresseur de l'air puis faire souffler l'air. Les températures d'entrée et de sortie de l'air de séchage sont fixées à 220 °C et 110 °C respectivement. Une fois les valeurs sont atteintes, l'eau doit circuler dans le système à ce que la température se stabilise. Puis les températures sont de nouveau fixées à 185 °C et 95 °C et l'eau est remplacée par la solution de marc de raisin. Les paramètres opérationnels de l'atomiseur sont une pression de 0.2 Mpa, une fréquence de 60 Hz et une vitesse de 10 tours/min.



**Figure MM 1 : L'atomiseur**



**Figure MM 2: La poudre obtenue après atomisation**

### **3 Identification et quantification des CP totaux**

#### **3.1 Dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu**

##### **3.1.1 Principe**

Il s'agit d'un dosage spécifique permettant de déterminer la concentration des CP totaux. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide

phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des CP par le réactif de Folin-Ciocalteu résulte en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximale à 750 nm, est proportionnelle à la quantité de CP présents dans la poudre. La quantification des CP nécessite de tracer une courbe d'étalonnage d'un CP standard comme l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalents d'acide gallique (GAE).

### 3.1.2 Protocole

Le dosage des CP totaux présents dans la poudre provenant des extraits du marc de raisin a été effectué selon la méthode de Singleton et Rossi en 1965 avec le réactif de Folin ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Il s'agit d'introduire dans un tube de 2 ml, 0,2 mL de solution étalon ou d'échantillon centrifugé et dilué et 1 mL du réactif de Folin (dilué dix fois dans l'eau distillée). Après agitation au vortex, 0,8 mL d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/L) sont introduits dans le tube. Ces tubes sont ensuite agités puis placés pendant 10 min à 60 °C puis 10 min à température ambiante. Une mesure de l'absorbance de la solution à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (UV- 9200, BioTECH Engineering Management, UK) permet de déterminer ensuite les concentrations en CP totaux dans chaque échantillon et cela à partir d'une gamme étalon d'acide gallique. La mesure d'absorbance est réalisée contre une solution de référence ne contenant pas les extraits de CP mais ayant subis toutes les étapes du dosage.

## 3.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

### 3.2.1 Principe

Il s'agit d'une méthode de séparation des constituants d'un mélange injecté à l'entrée de la colonne chromatographique. Un fluide appelé phase mobile parcourant la colonne, entraînera les constituants du mélange qui seront inégalement retenus lors de la traversée. A la sortie de la colonne le liquide passe dans un dispositif de détection à indice de réfraction, lui-même relié à un ensemble électronique capable d'amplifier, d'enregistrer et d'intégrer les signaux.

### 3.2.2 Protocole

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) sont réalisées à l'aide d'un système CLHP (Waters Alliance, USA) équipé d'une pompe Waters quaternaire e2695 (**Figure MM3**). La méthode a été adaptée suivant l'analyse de (Khoddami *et al.*, 2013). En plus

du détecteur UV-visible (250-700 nm), un détecteur à fluorescence (excitation 330 nm/émission 374 nm) a été utilisé avec le système de contrôle et le logiciel de collecte de données Empower 3. La séparation des CP a été réalisée sur une colonne Discovery C18, 5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm (Supelco, USA) munie d'une pré-colonne Supelguard Discovery 18, 20  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m (Supelco, USA) à 30 °C. La séparation de 100  $\mu$ l d'extrait de marc de raisin a été effectuée à un débit d'1 ml/min. La phase mobile A constituée de 5% (v/v) d'acide formique dans l'eau et la phase mobile B constituée de 100% de méthanol ont été utilisées. Le profil d'élution avait les proportions suivantes (v/v) de solvant B: 5 min, 8%; 50 min, 27%; 75 min, 50%; 85 min, 100% et maintenu à 5% de B pendant 25 min.



**Figure MM 3 : Le système Chromatographie Liquide à Haute Performance (Waters Alliance, USA)**

## 4 Etude des propriétés anti-radicalaires par la méthode au DPPH

### 4.1 Principe

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un des radicaux artificiels les plus utilisés pour examiner la capacité des extraits phénoliques à piéger les radicaux libres. L'électron libre du radical du DPPH, de couleur pourpre en solution dans le méthanol, a une forte absorption à 515 nm. Quand cet électron libre devient parié par un hydrogène à partir d'un radical libre d'un antioxydant, le DPPH-H réduit se forme et sa couleur vire par la suite vers le jaune pâle. L'effet de l'antioxydant sur le DPPH a été évalué quantitativement en suivant, la disparition du radical stable DPPH et donc la diminution de l'absorbance par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à 515 nm en utilisant des contrôles positifs connus par leurs activités antioxydantes et antiradicalaires comme le trolox (Zhang *et al.*, 2009).

### 4.2 Protocole

Il s'agit d'introduire 450 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) et 50 µL des échantillons à étudier ou des contrôles dans un tube eppendorf de 2 mL. Par la suite, 1,5 mL de la solution de DPPH (0,1 mM) sont ajoutés au mélange. Le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. A la fin de la période d'incubation, l'absorbance des milieux réactionnels est lue à 515 nm contre un blanc préparé avec du méthanol pur. Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH est calculé d'après la formule suivante :

% d'inhibition = [(absorbance du control (BHT) – absorbance de l'échantillon) / absorbance du control] x 100.

## **B. Etudes *in vivo* et *in vitro***

### ***In vivo***

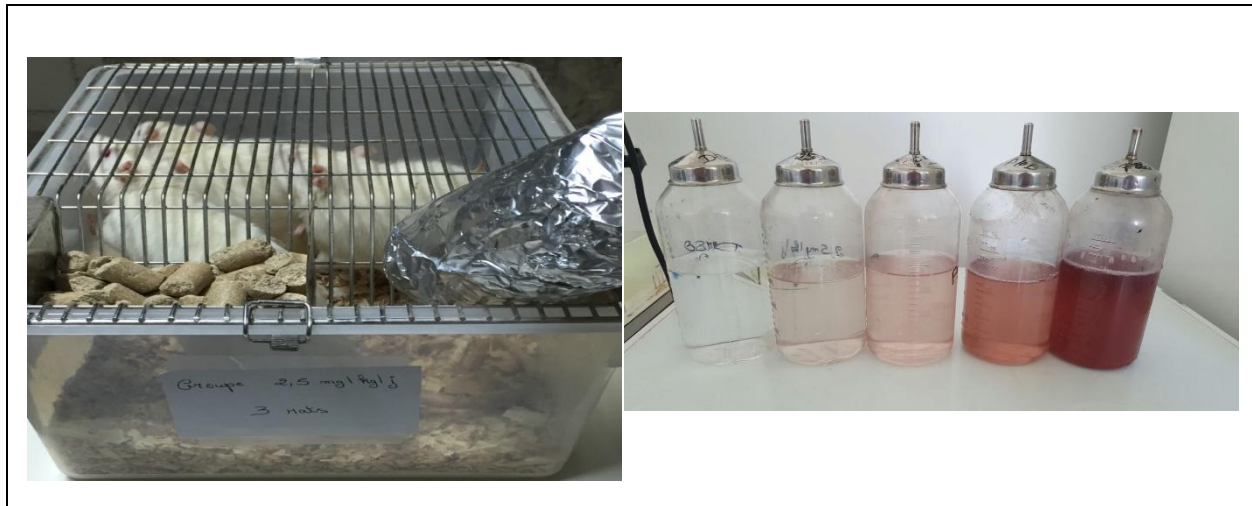
#### **1 Le modèle animal**

La présente étude est approuvée par le comité d'éthique de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ-215-46). Les protocoles sont conçus conformément aux principes du guide soin et utilisation des animaux approuvé par le conseil de la société américaine de physiologie. Les protocoles respectent également le guide soin et utilisation des animaux de laboratoire publié par l'institut national de santé des États-Unis (publication NIH numéro 85-23, révisée en 1996) et sont conformes à la directive du parlement européen (2010/63).

Quarante-huit rats Wistar mâles sont utilisés. Ils sont maintenus à une température stable ( $22 \pm 3$  °C), une humidité ( $50 \pm 5$  %) et sont exposés à un cycle 12 : 12 h de lumière et d'obscurité. Ils sont nourris par une nourriture pour rongeurs et sont acclimatés au moins une semaine dans ces conditions avant le début de l'étude.

##### **1.1 Le traitement des rats par les CP**

Le traitement des rats par les CP est journalier et pour une durée de 14 mois. Les rats sont répartis en 4 groupes traités (n=8 par groupe) par différentes concentrations (2.5 mg/kg/jour, 5 mg/kg/jour, 10 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour), 1 groupe DMSO à 0.1 % (n=6), le véhicule utilisé pour solubiliser la poudre dans l'eau et 1 groupe SHAM non traité (n=6), ces 2 derniers groupes sont représentés comme contrôles (**Figure MM4**).



**Figure MM 4: Différentes concentrations de CP administrées aux rats**

## 2 Mesure par échocardiographie des paramètres hémodynamiques

Les mesures échocardiographies permettent de suivre les changements de la performance cardiaque de manière non invasive (Boluyt *et al.*, 2004). Les échocardiographies sont effectuées chaque 3 mois pour tous les rats traités et contrôles à l'aide du système SonoScape SV2 accompagné d'une sonde de 10 MHz. Une fois les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (Ilium, Australie ; 75 mg/kg) et de xylazine (Interchemie, Hollande ; 10 mg/kg), leurs poitrines sont rasées puis ils sont placés en position dorsale sur une plaque. Les paramètres explorés sont les suivants :

- L'épaisseur du septum inter-ventriculaire (mm) : IVST
- L'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche (mm) : LVPW
- Le diamètre de la chambre ventriculaire (mm) : LVID
- La fraction d'éjection (%), d'après la méthode de Teicholz :

$$FE = (EDV - ESV)/EDV * 100$$

Avec EDV : « *End Diastolic Volume* », volume télédiastolique et ESV : « *End Systolic Volume* ».



- La fraction de raccourcissement (%), calculée à partir des diamètres du VG d'après la méthode de Teicholz :

$$FS = (LVIDd - LVIDs)/LVIDd * 100$$

### 3 Récolte d'urine et d'excréments

Les rats sont mis dans des cages métaboliques la veille de la récolte des urines et des excréments.

Les échantillons urinaires sont récoltés des rats traités et contrôles aux mois 1, 3, 6, 9 et 12 après début de traitement. Les échantillons sont centrifugés à 4500 rpm pour 30 min puis conservés à -20 °C jusqu'à analyse.

Les excréments sont récoltés de rats jeunes non traités par les CP (âgés de 2 mois) et des rats traités ou contrôles après 6 et 14 mois de traitement. Les selles sont stockées en condition anaérobiose à -80 °C jusqu'à analyse.

### 4 Mesure de la créatininurie et de l'albuminurie

La créatinine est dosée à l'aide du réactif enzymatique de créatinine CP ABX Pentra, destiné à la détermination quantitative *in vitro* de la créatinine dans l'urine par une méthode enzymatique avec une réaction photométrique au point final. L'enzyme créatinine amidohydrolase est utilisée pour convertir la créatinine en créatine. Cette dernière est décomposée en sarcosine et en urée par la créatine amidinohydrolase. Les dernières étapes où interfèrent la sarcosine oxydase et la peroxydase donnent une lecture chromogène à 545 nm.

ABX Pentra Micro Albumin 2 CP est un test immunoturbidimétrique développé pour mesurer avec précision la concentration de la micro-albumine dans les échantillons d'urine. Les anticorps anti-albumine du réactif réagissent avec l'albumine de l'échantillon en formant des complexes antigène-anticorps. L'agglutination qui en résulte est mesurée par turbidimétrie. Une mesure de l'absorbance permet de déterminer ensuite les concentrations en albumine dans chaque échantillon

## 5 Sacrifice des rats

Les rats sont sacrifiés après 14 mois de traitement. Les organes sont prélevés et perfusés avec du sérum physiologique et coupés dans le plan sagittal. Une partie est stockée à -80 °C pour l'extraction ultérieures des protéines, et la deuxième partie est fixée dans une solution de formol 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pour les études anatomopathologiques. Le sang est récupéré dans des tubes à EDTA puis centrifugé à la vitesse de 4500 rpm pendant 10 minutes. Le plasma ainsi recueilli est stocké à -80 °C pour les analyses biochimiques.

### *In vitro* en chronique

## 6 Etude anatomo-pathologique

Les tissus du cœur et du rein stockés dans le formol 10% sont coupés en sections de 5 µm puis inclus dans la paraffine. Les coupes sont colorées au trichrome de masson (TCM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pour mettre en évidence les fibres de collagène, et à l'hématoxyline/éosine (HE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pour évaluer l'infiltrat leucocytaire. Après la coloration, les coupes sont plongées dans des bains de rinçage, puis déshydratées dans des bains d'éthanol/eau avec une teneur en eau décroissante et enfin rincées au xylène. Les coupes histologiques sont montées sur des lames pour être observées au microscope optique au grossissement x 100. Leur analyse semi-quantitative est faite par deux pathologistes indépendants en aveugle.

### Etude de l'apoptose et du stress oxydatif de l'ADN

Le kit « In situ apoptosis detection kit » (Abcam, Cambridge, UK) est utilisé pour la reconnaissance des noyaux des cellules apoptotiques. L'altération de l'ADN a été évaluée en immunofluorescence à l'aide du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (Abcam, Cambridge, UK).

## 7 Etude protéomique par western blot

### 7.1 Principe

Le western blot est une technique qui permet de détecter et quantifier une protéine d'intérêt dans un échantillon protéique issu d'un tissu ou d'une culture cellulaire. Il s'agit en premier lieu d'extraire les protéines totales des échantillons, de les séparer dans un gel de polyacrylamide en

fonction de leur poids moléculaire grâce à un champ électrique, pour les transférer sur une membrane. La protéine d'intérêt est ensuite détectée grâce à un anticorps primaire reconnu par un anticorps secondaire couplé à un groupement enzymatique détecté par une révélation en chemiluminescence.

## **7.2 Extraction des protéines**

Les protéines sont extraites des tissus par un broyage mécanique. Le tissu est émergé dans une éprouvette contenant 8 ml de tampon de lyse (NaCl 150 mM, Tris OH pH 7.5 50 mM, EDTA 5 mM, IGEPAL 0.5%, mélange des inhibiteurs de protéases et de phosphatases) et subit un ou deux cycles de broyage. Ensuite, le broyat obtenu est conservé dans un bain de glace et subit une série de vortex. Enfin les échantillons sont aliquotés et stockés à -80 °C.

## **7.3 Dosage protéique**

Les protéines sont dosées suivant la méthode colorimétrique de Bradford. Le bleu de coomassie change de couleur après liaison avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés des protéines. Plus la couleur du colorant vire du brun au bleu, plus les échantillons sont riches en protéines. Le dosage a lieu à une longueur d'onde de 570 nm. L'étalonnage est réalisé à l'aide de solutions d'albumine sérum bovine (BSA).

## **7.4 Protocole du western blot**

Les échantillons protéiques sont dilués avec le tampon de charge laemmli 4x (BioRad, USA) avec 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, Allemagne).

La première étape consiste à déposer les échantillons protéiques par puit de sorte à les séparer en fonction de leur poids moléculaire par migration sur un gel composé de deux parties :

- Un gel de concentration (4.5% d'acrylamide/Bis, 0.5 M de Tris-HCl pH=6.8, 0.5% de SDS, 0.3% d'ammonium persulfate, et 0.1% de TEMED).
- Un gel de séparation (10% d'acrylamide/Bis, 1.5 M de Tris-HCl pH=8.8, 2% de SDS, 2% d'ammonium persulfate, et 0.1% de TEMED).

La migration débute sous un voltage constant de 70 V puis continue à 110 V dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH=8.3) (Bio-Rad, München ;

Allemagne). Un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Biorad) est utilisé afin de suivre la migration et déterminer la masse moléculaire des protéines.

La deuxième étape comprend l'électro-transfert des protéines du gel sur une membrane en polyfluorure de vinylidène PVDF (Bio-Rad laboratories Inc., Irvine, CA, USA) dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% éthanol, pH=8.8) (Bio-Rad, München; Allemagne). Le « sandwich » composé de la membrane et du gel auxquels sont ajoutés de chaque côté 3 papiers whatman et une éponge, est placé dans la cuve à électro-transfert à 0.4 A pendant 2h30 de temps.

L'étape de saturation précède l'immuno-détection des protéines d'intérêt. Les sites d'interactions au niveau de la membrane sont bloqués soit avec 5% BSA ou avec du lait écrémé dans le Tris Buffer Salt-Tween 1x (TBST) pendant une heure sous agitation à température ambiante, pour empêcher toute liaison non spécifique de l'anticorps.

La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, elle est rincée cinq fois pour 5 min chacune dans du TBST puis incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase de raifort (HRP) qui est révélée par chimiluminescence, puis à nouveau rincée cinq fois pour 5 min chacune dans du TBST.

La dernière étape est la révélation par l'ECL commercial (BioRad, USA). La solution d'ECL est incubée 5 min sur la membrane, puis la réaction de chimiluminescence est détectée grâce à un film photographique (GE Healthcare Amersham, USA). La quantification des bandes de protéines est réalisée à l'aide du logiciel "Image J".

## 7.5 Les anticorps utilisés

**Tableau MM 1 : Les anticorps primaires et secondaires et leurs concentrations utilisés pour l'analyse de l'expression des protéines d'intérêt.**

Analyse de l'expression de	Anticorps primaire utilisé/concentration	Anticorps secondaire utilisé/concentration
<b>NFATc3 (NFAT4)</b>	Anti-NFATc3 de lapin (Santa-Cruz) dilué au 1/500 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-NFATc3</b>	Anti-NFATc3 (phospho S165) de lapin (abcam) dilué au 1/500 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>Calcineurine</b>	Anti- PP2B-A $\beta$ (C-20) de chèvre (Santa-Cruz) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-chèvre (abcam) dilué au 1/10000 <sup>ème</sup>
<b>SOD 1</b>	Anti-SOD 1 de lapin (abcam) dilué au 1/2000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>SOD 2</b>	Anti-SOD 2 de lapin (abcam) dilué au 1/4000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>Smad 2</b>	Anti-Smad 2 de lapin (abcam) dilué au 1/500 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-Smad 2</b>	Anti-smad 2 (phospho S467) de lapin (abcam) dilué au 1/500 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>Smad 3</b>	Anti-Smad 3 de lapin (abcam) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-Smad 3</b>	Anti-Smad 3 (phospho S423 + S425) de lapin (abcam) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>CAMKII</b>	Anti-pan-CAMKII de lapin (Cell signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>

<b>p-CAMKII</b>	Anti-pan p-CAMKII de lapin (Cell signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>Troponine</b>	Anti-troponin I (C-4) de souris (Santa-Cruz) dilué au 1/1500 <sup>ème</sup>	Anti-souris (abcam) dilué au 1/10000 <sup>ème</sup>
<b>GSK</b>	Anti-GSK 3 $\beta$ de lapin (Cell Signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-GSK</b>	Anti-p-GSK 3 $\beta$ de lapin (Cell Signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>ERK1/2</b>	Anti-ERK1/2 de lapin (abcam) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-ERK 1/2</b>	Anti-p-ERK1/2 de lapin (abcam) dilué 1/10000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>P38 MAPK</b>	Anti-P38 de lapin (Cell signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p-P38 MAPK</b>	Anti-phospho-P38 MAPK (Thr180/Tyr182) de lapin (Cell signaling) dilué au 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Anti- NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) de lapin (Cell Signaling) dilué 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>p- NF-<math>\kappa</math>B</b>	Anti-Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1) de lapin (Cell Signaling) dilué 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>
<b>GAPDH</b>	Anti- GAPDH de lapin (abcam) dilué au 1/2500 <sup>ème</sup>	Anti-lapin (abcam) dilué au 1/3000 <sup>ème</sup>

## 8 ELISA

### 8.1 Principe

L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection permettant de doser une protéine dans un liquide biologique. Il s'agit de visualiser une interaction antigène-anticorps par une révélation colorimétrique. Donc un premier Ac est spécifique de l'antigène, alors que le deuxième Ac couplé à un enzyme émet un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

### 8.2 Protocole

Les concentrations plasmatiques de l'interleukine 6 (IL-6), de la protéine C-réactive (CRP), du facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et du peptide natriurétique cérébral (BNP) sont mesurées à l'aide de kits ELISA spécifiques à chaque protéine. Les essais sont effectués suivant les instructions de chaque kit : TGF- $\beta$  (Rat) kit, IL-6 (Rat) kit, CRP (Rat) kit and BNP-32 Rat kit (BioRad laboratories, CA, UK).

Les ELISA sont effectuées dans des plaques de 96 puits couverts au fond d'anticorps monoclonaux spécifiques de la molécule cible recherchée. Dans ces puits sont déposés les échantillons plasmatiques des rats et la gamme du standard, suivi d'une incubation pour une durée donnée sur une plaque rotatoire à une vitesse définie. Puis, après une série de lavage avec une solution spécifique fournie par le kit, l'anticorps secondaire est ajouté. A la fin de la période d'incubation, la plaque est rincée plusieurs fois, puis révélée avec une solution substrat à l'obscurité pendant une durée variable selon la protéine cible. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde recommandée à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantification de la protéine dans les échantillons nécessite de tracer une courbe d'étalonnage du standard.

## 9 Analyse quantitative des bactéries du microbiote intestinal par qPCR

### 9.1 Principe

La Quantitative Polymerase Chain reaction (qPCR) permet la quantification spécifique et reproductible des acides nucléiques à tout instant du processus. Pour la détection quantitative des amplicons, on a recours soit aux agents se liant à l'ADN double brin soit aux sondes fluorescentes. Dans cette étude, on a utilisé l'agent intercalant : le SYBR green. Cette technologie repose

entièrement sur les amorces et ne nécessite aucune sonde fluorescente. La quantification de la quantité relative de l'ADN dans les échantillons est réalisée en mesurant le Ct et en utilisant une courbe standard afin de déterminer le nombre de copies de départ (Arya *et al.*, 2005).

## 9.2 Extraction d'ADN fécal

L'ADN total est extrait de 150 mg d'échantillon fécal à l'aide du kit « Isolate Fecal DNA » (Bioline; Alexandria, NSW, Australia). La concentration de l'ADN est mesurée par le spectrophotomètre nanodrop 2000c (Thermoscientific; USA).

## 9.3 Protocole de qPCR

L'analyse quantitative de certains groupes bactériens du microbiote interstinal est réalisée par qPCR. Les groupes bactériens choisis sont : le groupe *Bacteroides/Prevotella*, le genre *Bifidobacterium*, le genre *Enterococcus*, le groupe *Lactobacillus/Leuconostoc*, le sous-groupe *Clostridium leptum* et *Clostridium sensu stricto* (cluster I) (*Clostridium* Cluster I). Les bactéries ciblées, les températures d'hybridation et les séquences d'amorces figurent dans le **tableau MM2**. La qPCR est réalisée dans une plaque 96 puits scellée avec des adhésifs microseals (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Tableau MM 2 : Les bactéries ciblées, les températures d'hybridation et les séquences d'amorces utilisées en qPCR**

Target bacteria	Annealing (°C)	Sequence (5'-3')
<b>All bacteria</b>	55	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT
		GGA CTA CCA GGG TAT CTA A
<b><i>Bacteroides/Prevotella</i> group</b>	59	GAA GGT CCC CCA CAT TG
		GCA CTT AAG CCG ACA CCT
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	62	GGG TGG TAA TGC CGG ATG
		CCA CCG TTA CAC CGG GAA
<b><i>Enterococcus</i></b>	60	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT



		ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT
<i>Lactobacillus/</i>	64	CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA
<i>Leuconostoc</i> group		AGC AGT AGG GAA TCT TCC A
<i>Clostridium leptum</i>	55	GCA CAA GCA GTG GAG T
subgroup		CTT CCT CCG TTT TGT CAA
<i>Clostridium</i>	58	TAC CHR AGG AGG AGG CCA C
(cluster I)		G TTC TTC CTA ATC TCT ACG CAT

## 10 Détection des métabolites urinaires par spectrométrie de masse LC-QTOF

### 10.1 Protocole

La caractérisation des échantillons est réalisée avec une chromatographie liquide ultra-performance couplée à un spectromètre de masse QTOF (UPLC/MS) (Bruker Maxis Impact HD) et équipée d'une source d'ionisation par électrospray en mode négatif. Les ions formés sont caractérisés par leur ratio masse sur charge,  $m/z$ , nos métabolites sont balayés entre 50 et 1000  $m/z$ . La séparation des métabolites urinaires est réalisée sur une colonne Acquity UPLC C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm (Waters, Irlande) avec une pré-colonne Acquity UPLC C18 VanGuard, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 5 mm (Waters, Irlande). La température de la source est réglée à 200 °C avec un débit de gaz du cône de 500  $\mu\text{l.h}^{-1}$ , une température du gaz de désolvatation de 300 °C et un débit de gaz de nébulisation de 400  $\text{L.h}^{-1}$ . Le volume d'injection est de 10  $\mu\text{l}$ . La phase mobile A constituée de 0.1% acide formique dans l'eau ultrapure et la phase mobile B constituée de 0.1 % acide formique dans le méthanol sont utilisées. Le profil d'élution a les proportions suivantes (v/v) : 95-5 % de solvant A à 5-95 % de solvant B pendant 10 min. Le QTOF est calibré avec l'acétate et formate de sodium. Les analyses sont sous-traitées dans l'unité d'analyse spectrométrie de masse à l'université de Poitiers.

*In vitro en aigu***11 Isolement cellulaire des fibroblastes cardiaques de rat**

Un rat Wistar en moyenne de 300 g est dans un premier temps anesthésié par injection intrapéritonéale d'hydrate de chloral (0.5 ml pour 100g). Le cœur est ensuite prélevé rapidement puis plongé dans une solution de Tyrode froide. Les adhérences et les oreillettes sont retirées du cœur puis les ventricules sont découpés en petits morceaux homogènes d'environ 1 mm<sup>3</sup> dans une solution de KREBS additionnée de 30 mM de 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) et 0.5 mM d'EGTA. Après trois rinçages au Krebs supplémenté de 1% BSA, les morceaux de tissu ventriculaire sont soumis à une prédigestion à 37 °C pour 20 min dans une solution de Krebs BSA contenant 165 UI/ml de collagénase type V (Sigma-Aldrich, USA) et 6 UI/ml de protéase type XXIV (Sigma-Aldrich, USA). Après récupération du surnageant, cette étape est suivie d'une deuxième étape de digestion dans une solution de Krebs BSA avec 157 UI/ml de collagénase type V.

Une fois la dissociation enzymatique terminée, les morceaux de tissu ventriculaire sont ensuite soumis à une dissociation mécanique avec une pipette pasteur rodée dans une solution d'HEPES contenant 2% BSA (**tableau MM3**). Les cellules isolées sont filtrées à l'aide d'un filtre de porosité de 200 µM puis centrifugées à 500 rpm pour 10 min. Le surnageant est récupéré et refiltré grâce à un filtre de porosité de 20 µM. Le filtrat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pour 10 min. Le culot de fibroblastes obtenu est resuspendu dans du milieu DMEM additionné de 10<sup>-7</sup>M d'insuline, 1% d'antibiotiques (100 UI/ml de streptomycine + 50 UI/ml de pénicilline), 0,1% de SVF. Afin de déterminer le nombre des fibroblastes cardiaques isolés, un comptage est réalisé en cellule de Malassez (**Figure MM5**).

Les fibroblastes obtenus sont ensemencés dans des boîtes de cultures et incubés à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un incubateur.

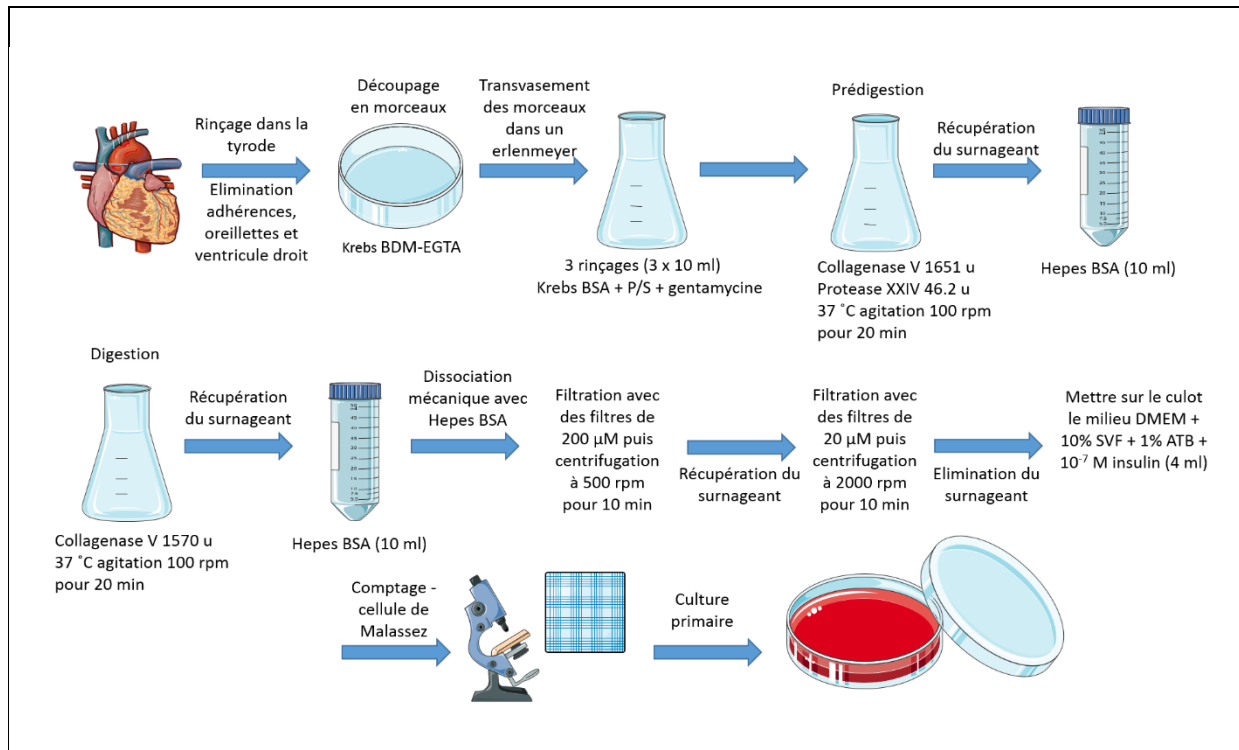


Figure MM 5 : Protocole d'isolement de fibroblastes cardiaques de rat.

Tableau MM 3: Composition des solutions utilisées pour la dissociation des fibroblastes de rats

(mM)	Tyrode	KREBS-BDM-EGTA	KREBS-BSA	HEPES-BSA
<b>NaCl</b>	150	35	35	130
<b>KCl</b>	5.4	7.75	7.75	4.8
<b>HEPES</b>	10	10	10	25
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>		20	20	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>		1.18	1.18	1.2
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>		25	25	
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1.8			
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1.8			
<b>EGTA</b>		0.5		0.15
<b>D-glucose</b>	10	10	10	5
<b>Saccharose</b>		70	70	
<b>BSA</b>			1%	2%
<b>BDM</b>		30		
<b>pH</b>	7.4	7.4	7.4	7.4

## 12 Technique d'électrophysiologie : Le patch-clamp

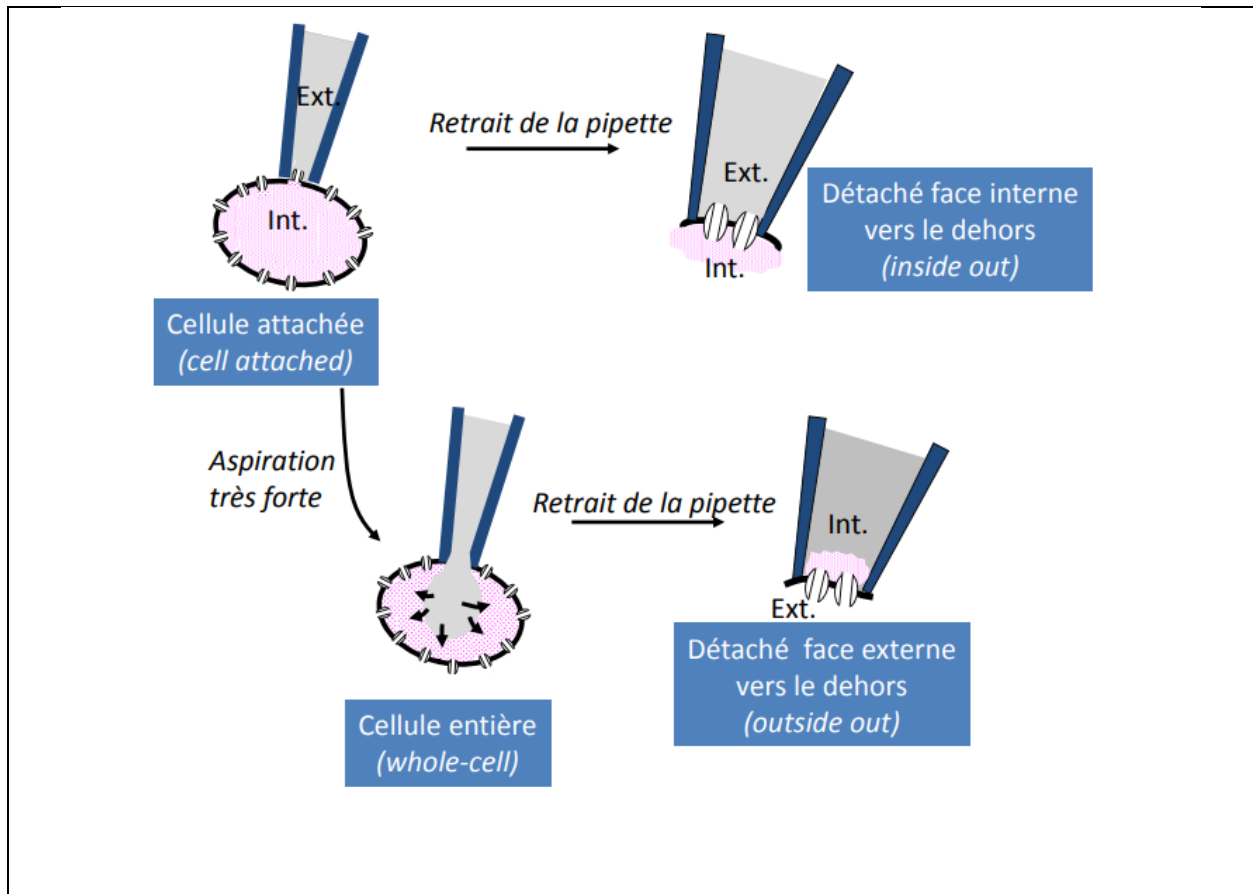
### 12.1 Principe

Le patch clamp est une technique qui permet de maintenir sur une cellule isolée ou sur un fragment de membrane de cette cellule un potentiel ou un courant constant pour que les variations de perméabilités ioniques se traduisent par des variations de courant ou de potentiel mesurables.

Cette technique consiste concrètement à isoler électriquement une portion de membrane cellulaire en appliquant sur la membrane une pipette de verre remplie de liquide conducteur. La membrane accolée au verre de la pipette par un phénomène mécanique et physico-chimique permet un scellement étroit de haute résistance. Les canaux ioniques présents sur le fragment de membrane isolé sous la pipette peuvent être détectés par un système d'amplification. L'intensité des courants enregistrés est de l'ordre du picoampère (pA) ou nanoampère (nA).

Le patch-clamp permet d'enregistrer l'activité électrique des cellules grâce à plusieurs configurations (**Figure MM6**). La configuration dans laquelle la pipette est juste accolée à la membrane, est nommée configuration cellule-attachée où on enregistre juste l'activité de quelques canaux présents sur le fragment de membrane isolé sur la pipette. Elle ne permet pas de contrôler le milieu intracellulaire, mais a l'avantage de préserver l'intégrité de la cellule.

A partir de cette configuration, la membrane peut être rompue sous la pipette par dépression intrapipette. Ainsi, on se trouve en continuité entre le milieu intrapipette et le milieu intracellulaire d'où la possibilité d'enregistrer les courants traversant les canaux présents sur la totalité la membrane cellulaire ; c'est la configuration cellule-entière. D'autres configurations de la technique de patch clamp sont encore possibles. En quelques mots, l'inside-out est une configuration où la portion de la membrane scellée à la pipette est excisée par un léger retrait de la pipette. Cela permet d'étudier l'effet de la nature du milieu baignant la face interne de la membrane sur l'activité des canaux ioniques présents sur le fragment de membrane. Alors que pour la configuration outside-out, il s'agit d'exciser la membrane après avoir réalisé la cellule-entière. Cela permet d'étudier finement l'effet du milieu baignant la face externe de la membrane sur l'activité individuelle des canaux. La configuration pratiquée dans notre étude est celle de la cellule-entière (**Figure MM6**).



**Figure MM 6 : Les différentes configurations de la technique de patch-clamp**

### 12.2 Protocole

L'approche de la micropipette se fait à l'aide d'un microscope inversé à vision binoculaire (Olympus, Japon), d'un micromanipulateur et d'une table antivibratoire situés dans une cage de Faraday qui permet d'éviter les bruits de fond. Il existe également dans cette cage un système de perfusion permettant l'application des molécules destinées à être testées dans le milieu extracellulaire. Les micropipettes sont étirées à partir de capillaires de verre GC150T-7.5 (Harvard Apparatus) par une étireuse verticale (Narishige, Japon). La résistance électrique de la pipette doit être préférablement de l'ordre de 2 à 3 M $\Omega$  après remplissage par la solution intrapipette. La pipette est ensuite fixée sur la tête de l'amplificateur de façon à ce qu'un fil d'argent chloruré servant d'électrode soit mis en contact avec le liquide intrapipette. Une seconde électrode dite de référence est située dans le milieu extracellulaire. L'amplificateur Axopatch 200 B, permet d'amplifier les courants transmembranaires avant d'être enregistrés informatiquement par le programme Pclamp

(version 8) (Axon Instrument). Ce dernier permet de définir les protocoles expérimentaux de stimulation ainsi que d'acquérir et d'analyser les données. Une carte de conversion A/D – D/A (Digidata 1322 A, Axon Instrument) constitue le lien entre l'ordinateur et l'amplificateur (**Figure MM7**).



**Figure MM 7 : Le poste de patch-clamp**

Les solutions utilisées lors de nos expérimentations en patch clamp sont détaillées dans le **tableau MM4** suivant.

**Tableau MM 4 : Les milieux extracellulaire et intrapipette**

<b>Milieu extracellulaire (mM)</b>	
<b>NaCl</b>	140
<b>KCl</b>	5.4
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1
<b>Glucose</b>	10
<b>HEPES</b>	10
<b>pH</b>	7.4

<b>Milieu intrapipette (mM)</b>	
<b>NaCl</b>	8
<b>KCl</b>	20
<b>K-aspartate</b>	110
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1
<b>NaGTP</b>	2
<b>EGTA</b>	10
<b>HEPES</b>	10
<b>pH</b>	7.2

**Les molécules testées :**

Nous serons amenés à tester les effets seuls ou combinés du pinacidil et de la poudre de CP. Ces deux produits sont dissouts dans du DMSO dont la concentration finale est égale à 0.1%. A cette concentration, nous avons observé que le DMSO n'a aucun effet électrophysiologique.

**13 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SigmaPlot.

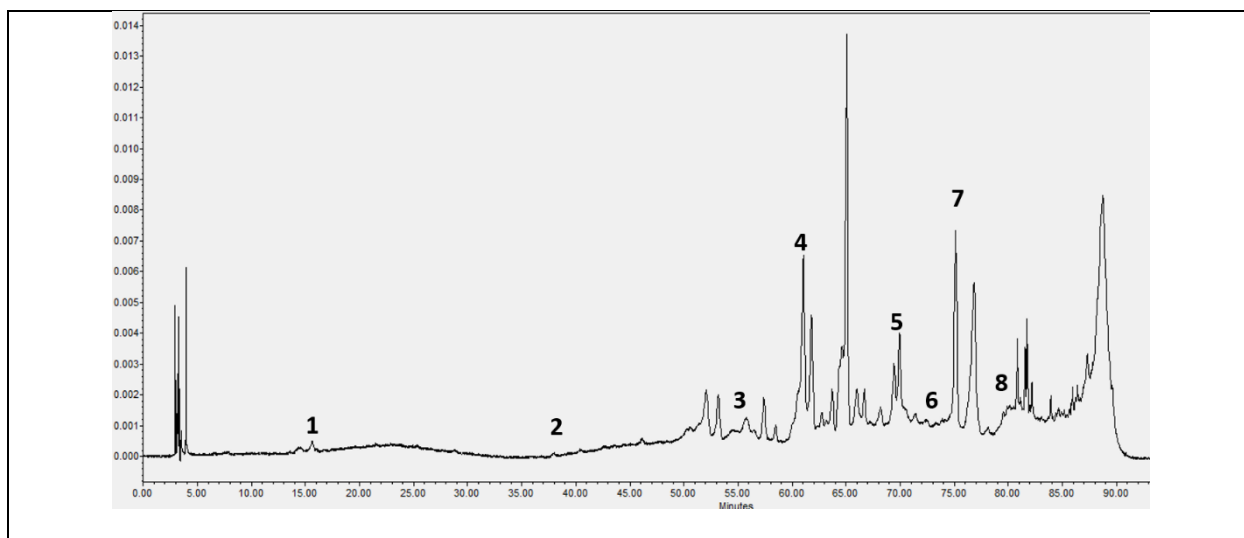
Le test statistique One-Way ANOVA a été appliqué pour la comparaison des paramètres enregistrés entre les groupes traités et contrôles. Pour les analyses prenant en considération le temps et le traitement, le test statistique utilisé est le Two-Way ANOVA. Dans tous les cas, lorsque l'ANOVA était significative, l'analyse était poursuivie par l'application d'un test post-hoc Student–Newman–Keuls.

Les différences sont considérées comme étant significatives quand  $p < 0.05$ . n représente le nombre de rats. Les données sont présentées sous forme Moyennes  $\pm$  Standard error of mean (SEM). \*,\*\* et \*\*\* correspondent respectivement à un degré de significativité 0.05, 0.01 et 0.001. L'absence d'astérisque correspond à une absence de significativité.

### III. Résultats

#### 1 Caractérisation de la poudre obtenue à partir du marc de raisin

La caractérisation de la poudre après extraction et atomisation des solutions de CP de marc de raisin, était indispensable permettant de savoir la qualité de la poudre qui va être administrée aux rats pendant 14 mois. Les résultats de l'analyse de Folin-Ciocalteu ont révélé que la poudre obtenue contient 920 mg/g de CP (92% de la masse totale de la poudre) et les 8% restants sont des sucres résiduels et d'autres composés non déterminés co-extraits avec les CP. D'après le test de DPPH, nous avons obtenu la capacité anti-radicalaire de la poudre qui est de 6028 micromolar trolox équivalent per milliliter ( $\mu$ MTE), l'équivalent de 92% d'inhibition de radicaux libres. L'identification et la quantification de 8 CP présents dans la poudre est réalisée par CLHP (**Figure R1**). D'autres CP sont également présents dans la poudre mais non caractérisés en raison d'un nombre limité de standards au laboratoire.



**Figure R1 : Le chromatogramme obtenue après analyse de la poudre par CLHP**

Les pics numérotés sont les CP identifiés et quantifiés. **1.** Catechine (0.8 mg/g de poudre) ; **2.** Acide coumarique (0.75 mg/g de poudre) ; **3.** Delphinidine (27.8 mg/g de poudre) ; **4.** Rutine hydrate (5.8 mg/g de poudre) ; **5.** Malvidine (42 mg/g de poudre) ; **6.** Acide trans-cinnamique (0.17 mg/g de poudre) ; **7.** Quercetine (3.4 mg/g de poudre) ; **8.** Kaempferol (0.39 mg/g de poudre).



## 2 Effet des CP administrés à long terme aux rats sur le vieillissement cardiovasculaire

Cette partie exposera les résultats portant sur l'effet produit par les CP sur le remodelage cardiaque associé à l'âge. En effet, l'âge est un facteur de risque de développement de nombreuses maladies parmi lesquelles on peut citer les maladies cardiovasculaires. Le remodelage cardiaque associé au vieillissement comprend la senescence cardiomyocytaire, la prolifération des fibroblastes, l'inflammation et l'hypertrophie. Le déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les mécanismes de défense intracellulaires est responsable du remodelage du cœur observé avec l'âge. Plusieurs études ont montré que les CP possèdent des propriétés physiologiques favorisant notre organisme grâce à des effets antioxydants. Par conséquent, ces composés pourraient retarder le vieillissement par réduction des ERO. Cependant, l'utilisation à long terme de ces molécules sous forme de mélange de plusieurs composés n'a pas été étudiée. L'objectif de cette partie de la thèse est d'en évaluer, sur des jeunes rats mâles, les effets des CP administrés à différentes concentrations, pendant quatorze mois. Les caractéristiques de la poudre riche en CP administrée aux rats figurent dans la partie III.1.

Un article intitulé : **Long term intake of phenolic compounds attenuates aging-related cardiac remodeling of rat hearts**, présentera les résultats obtenus. Cet article est actuellement soumis dans le journal « **Aging cell** ».

En résumé, les paramètres échocardiographiques mesurés chaque 3 mois de l'étude ont révélé que les groupes traités par les CP montrent une préservation dose-dépendante avec l'âge des fractions d'éjection et de raccourcissement par rapport aux témoins non traités, ainsi qu'une réduction de l'hypertrophie reflétée par le diamètre de la chambre ventriculaire et l'épaisseur de la paroi postérieure comparés aux rats contrôles.

Selon la littérature, le vieillissement induit des changements dans l'expression des protéines impliquées dans les voies hypertrophiques cellulaires telles que NFATc3, calcineurine, ERK1/2, CAMKII et GSK 3 $\beta$ . Les analyses des protéines cardiaques par western blot ont montré qu'il résulte une augmentation de l'expression de la calcineurine et du rapport p-CAMKII/CAMK et p-GSK 3 $\beta$ / GSK 3 $\beta$  chez les groupes contrôles. En revanche les CP de manière dose-dépendante semblent empêcher cette augmentation. De plus, les niveaux d'expression de la phosphorylation de NFATc3 et de p-ERK1/2 n'ont pas été altérés chez les rats contrôles, mais ont été significativement modifiés chez les groupes consommant 10 et 20 mg/kg/jour de CP.

Afin d'évaluer le degré d'inflammation des cœurs de nos rats en cours de vieillissement, une analyse semi-quantitative des coupes myocardiques colorées à l'HE a révélé une inflammation interstitielle chez les rats témoins âgés de 17 mois. Cependant, une protection dose-dépendante et significative contre les processus inflammatoires liés à l'âge a été observée chez les groupes consommant les CP. Ces derniers ont également montré une réduction significative des concentrations plasmatiques de CRP et d'IL-6 et du niveau d'expression de p-P38.

Au cours du vieillissement, le cœur devient vulnérable à la fibrose. Pour cette raison, nous avons effectué une analyse semi-quantitative des coupes de cœur colorées au TCM. Les résultats ont révélé un pourcentage de zone fibrotique significativement plus élevé chez les rats contrôles par rapport aux jeunes. Même à la plus faible concentration testée, les rats consommant des CP ne montrent pas des caractéristiques de fibrose liée à l'âge. Par la suite, nous avons testé la concentration plasmatique de TGF- $\beta$ . Celle-ci a augmenté chez les groupes contrôles par rapport aux rats jeunes. Cet effet n'existe pas chez les animaux traités par les CP. Ces changements ont été confirmés par évaluation du déséquilibre cellulaire Smad 2 et Smad 3. Nous avons observé une augmentation significative du rapport p-Smad 2/Smad 2 et p-Smad 3/Smad 3 chez les rats contrôles par rapport aux rats jeunes, un effet non observé chez les rats âgés de 17 mois traités par les CP.

Vu que le déséquilibre entre la production des ERO et les mécanismes de défense intracellulaires est responsable du remodelage du cœur observé avec l'âge, nous avons effectué la coloration TUNEL pour déterminer le pourcentage des cellules apoptotiques dans les cœurs de rats âgés de 17 mois témoins et traités. Le pourcentage des cellules TUNEL positives chez les rats témoins était significativement plus élevé que celui des rats jeunes. Une consommation de CP de CP semble empêcher de façon dose-dépendante cette augmentation liée à l'âge.

Une évaluation immunohistochimique de la 8-OHdG, un biomarqueur critique des dommages liés à l'altération de l'ADN, a montré un pourcentage supérieur de cellules positives 8-OHdG chez les groupes témoins comparés aux groupes traités par les CP.

Enfin, l'expression de l'activité de l'enzyme antioxydante SOD 1 a été réduite chez les rats contrôles âgés de 17 mois, mais cet effet n'est pas observé chez les rats consommant les CP à une

concentration supérieure à 2.5 mg/kg/jour. De même, l'activité de l'enzyme antioxydante SOD 2 était significativement plus élevée chez les groupes PC 5, PC 10 et PC 20 par rapport aux groupes témoins.

Les résultats de cette partie suggèrent que dans un modèle murin, une consommation régulière de CP préserve le cœur du remodelage lié au vieillissement. Concernant la nature des éléments responsables des effets observés, nous avons déjà abordé la nature des CP dans la partie III.1 et devons déterminer encore d'autres CP présents dans la poudre grâce à de nouveaux standards actuellement indisponibles au laboratoire et chercher les métabolites présents dans le cœur afin de déterminer la nature de tous les composés et/ou métabolites responsables des effets bénéfiques produits.

## Long term intake of phenolic compounds attenuates age-related cardiac remodeling

Stéphanie Chacar<sup>1,2,3</sup>, Joelle Hajar<sup>1#</sup>, Youakim Saliba<sup>1#</sup>, Patrick Bois<sup>3</sup>, Nicolas Louka<sup>2</sup>, Richard G. Maroun<sup>2</sup>, Jean-François Faivre<sup>3#</sup>, Nassim Fares<sup>1#\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Recherche en Physiologie et Physiopathologie, LRPP, Pôle Technologie Santé, Faculté de Médecine, Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban.

<sup>2</sup> Centre d'Analyses et de Recherche, UR GPF, Laboratoire CTA, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

<sup>3</sup> Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), Université de Poitiers EA 7349, Poitiers, France.

#contributed equally to this work respectively

\***Corresponding author** : Nassim Farès, Laboratoire de Recherche en Physiologie et Physiopathologie, LRPP. Pôle Technologie Santé, Faculté de Médecine, Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban.

Tel : 00961-1-421000, ext 6772

Fax : 00961-1-421022

Email : [nassim.fares@usj.edu.lb](mailto:nassim.fares@usj.edu.lb)

**Email addresses:** CHACAR Stéphanie ([stephanie.chacar@net.usj.edu.lb](mailto:stephanie.chacar@net.usj.edu.lb)); HAJAL Joelle ([joelle.hajal@usj.edu.lb](mailto:joelle.hajal@usj.edu.lb)); SALIBA Youakim ([youakim.saliba@usj.edu.lb](mailto:youakim.saliba@usj.edu.lb)); BOIS Patrick ([patrick.bois@univ-poitiers.fr](mailto:patrick.bois@univ-poitiers.fr)); LOUKA Nicolas ([nicolas.louka@usj.edu.lb](mailto:nicolas.louka@usj.edu.lb)); MAROUN Richard ([richard.maroun@usj.edu.lb](mailto:richard.maroun@usj.edu.lb)); FAIVRE Jean-François ([jean-francois.faivre@univ-poitiers.fr](mailto:jean-francois.faivre@univ-poitiers.fr)); FARES Nassim ([nassim.fares@usj.edu.lb](mailto:nassim.fares@usj.edu.lb)).

**Running title: Phenolic compounds attenuate cardiac aging**

### KEYWORDS

Phenolic compounds – aging – cardiac remodeling – oxidative stress – fibrosis - hypertrophy

## Summary

With the onset of advanced age, cardiac-associated pathologies have increased in prevalence. The hallmarks of cardiac aging include cardiomyocyte senescence, fibroblast proliferation, inflammation and hypertrophy. The imbalance between levels of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant enzymes is greatly enhanced in aging cells, promoting cardiac remodeling. In this work, we studied the long-term impact of phenolic compounds (PC) on age-associated cardiac remodeling. Three month old Wistar rats were treated for fourteen months till middle-age with either 2.5, 5, 10 or 20 mg/kg/day of PC. PC treatment showed a dose-dependent preservation of cardiac ejection fraction and fractional shortening as well as decreased hypertrophy reflected by left ventricular chamber diameter and posterior wall thickness as compared to untreated middle-aged control animals. Analyses of proteins from cardiac tissue showed that PC attenuated several hypertrophic pathways including calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFATc3), calcium/calmodulin dependent kinase II (CAMKII), extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK 3 $\beta$ ). PC-treated groups exhibited reduced plasma inflammatory and fibrotic markers and revealed as well ameliorated extracellular matrix remodeling and interstitial inflammation by a downregulated p38 pathway. Myocardia from PC treated middle-aged rats presented less fibrosis with suppression of pro-fibrotic transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1) Smad pathway. Additionally, reduction of apoptosis and oxidative damage in PC treated groups was reflected by elevated anti-oxidant enzymes and reduced RNA/DNA damage markers. Our findings pinpoint that a daily consumption of phenolic compounds could preserve the heart from the detrimental effects of aging storm.

## 1. Introduction

Aging is a physiological process that affects the overall health status of the organism. As the average life expectancy continues to rise in the developed world, aging has been the world's biggest killers for the last 15 years (WHO, 2017). Aging by itself is a leading risk factor for the development of several diseases, including cardiovascular ones (Liao *et al.*, 2015). Both heart and vessels are subject to significant phenotypic and genotypic remodeling, leading to cardiovascular function impairment. At a more elaborate level, degeneration of the intracellular defense mechanisms with age stands behind major structural and functional changes of the heart (Steenman and Lande, 2017). In other words, the disruption of homeostasis between reactive oxygen species (ROS) and endogenous antioxidants leads to oxidative stress. This process is associated with lipid peroxidation, DNA damage, cellular dysfunction and induction of apoptosis (Azevedo *et al.*, 2016). It interferes with the modulation of several intracellular signaling pathways involved in all aspects of cardiac fibrosis, inflammation and hypertrophy, and, therefore notably promoting the pathogenesis of cardiovascular diseases (Kubin *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015; Moris *et al.*, 2017). Oxidative stress appears to be a crucial modulator of the age-related fibrotic process; in which, an excessive appearance of extracellular matrix (ECM) contributes to tissue injury (Richter and Kietzmann, 2016). The prevalence of cardiac interstitial and perivascular fibrosis have been repeatedly reported in the senescent heart and have been associated with elevated levels of ROS, endothelin-1, total collagen content and pro-fibrotic transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (Biernacka and Frangogiannis, 2011).

Progressive cardiac fibrosis is nowadays considered as a contributing factor leading to ventricular stiffness and cardiac dysfunction (Horn and Trafford, 2016; Gyongyosi *et al.*, 2017).

Extensive evidence suggests that aging also induces an inflammatory response in the host's heart and that oxidative stress and inflammation are interdependent mechanisms (Petersen and Smith, 2016). In fact, repeated exposure to ROS causes oxidative cell damage that may contribute to a pro-inflammatory signaling response such as the release of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Moreover, the binding of this pro-inflammatory cytokine to its receptor activates the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inflammasome, therefore promoting the production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) among many others (Kim *et al.*, 2008). Importantly, TNF- $\alpha$ , C-reactive protein (CRP), NF- $\kappa$ B and cyclooxygenase 2 (COX-2) are the major inflammatory mediators in the heart (Lopez-Candales *et al.*, 2017).

As for cardiac hypertrophy, a form of structural and functional remodeling of the heart, it could normally occur in response to increases of ROS during aging (Martin-Fernandez and Gredilla, 2016). ROS can directly or indirectly induce hypertrophy through activation of several intracellular proteins and signaling pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase C (PKC), NF- $\kappa$ B, calcineurin and tyrosine kinases (Heineke and Molkenin, 2006; Moris *et al.*, 2017).

Aging is an inevitable physiological process, but the associated complications could be avoided according to the individual lifestyle. Before reaching a level where a medicinal treatment becomes necessary to heal the resultant complications of aging, the prevention of fibrosis, hypertrophy and inflammation that occur in response to oxidative stress has been hypothesized through a supplementation with nutrients or an antioxidant rich-diet such as polyphenol-rich matrices, based on other non-aging cardiac stress animal models (Khurana *et al.*, 2013).

Phenolic compounds (PC) exert several medicinal and health benefits (Varzakas *et al.*, 2016). Studies have shown that PC possess physiological properties favoring anti-diabetes, vasodilatory,

anti-microbial, anti-thrombotic, anti-inflammatory, anti-hypertensive and especially antioxidant effects (Conforti *et al.*, 2008; Hanhineva *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2012b; Khurana *et al.*, 2013). These compounds have been speculated to delay aging through mechanisms that involve the reduction of ROS. However, the long term *in vivo* use of these molecules as a mixture which reflects their daily consumption in a food matrix has not been investigated yet. In this study, the long-term cardiac impact of a daily consumption of different concentrations of a PC mixture during the lifespan of healthy rats was explored. During the treatment, hemodynamic and functional cardiovascular parameters were evaluated in all groups. At 17 months old, approximately at their middle-age, cardiac hypertrophic, fibrotic, inflammatory, apoptotic and oxidative signaling pathways were investigated.

## 2. Results

### 2.1 Phenolic compounds preserve cardiac morphological and functional properties altered with aging

Given that cardiac structure and performance are subjected to changes with age (Lakatta and Levy, 2003), we investigated by echocardiography the heart status in our model. Rats from all groups exhibited comparable cardiac chamber morphology and contractility at baseline (Figure 1). At the age of 17 months, the left ventricular internal diameter in diastole (LVIDd) and the left ventricular posterior wall in diastole (LVPWd) were significantly higher in control groups (SHAM and DMSO) compared to baseline values (Figure 1a, b). In contrast, no significant effect of time or treatment was observed on end-diastolic inter-ventricular septum (IVSTd) in all groups (Figure 1c). Interestingly, LVPWd and heart chamber volume were rescued in groups treated with PC>2.5 mg/kg after 14 months of treatment. On the other hand, ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) of control rats, were significantly depressed with age when compared to baseline



values (Figure 1d, e). However, following 14 months of PC 5, PC 10 and PC 20 consumption, cardiac function was ameliorated, and EF/FS values were significantly higher versus control groups (Figure 1 d, e).

Body weights (BW), whole heart weights (HW) and tibia lengths (TL) of all rats were also measured. Table 1 shows that HW/BW ratio remained unchanged during aging. However, HW/TL ratio increased significantly in control and PC treated groups compared to young rats.

### **2.2 Long term consumption of PC attenuates age-induced cardiac hypertrophy**

Aging induces changes in the expression of proteins involved in the cellular hypertrophic pathways such as NFATc3, calcineurin, ERK1/2, CAMKII and GSK 3 $\beta$  (Mudd and Kass, 2008). In the present study, aging resulted in the increased expression of calcineurin (Figure 2b) and the phosphorylated to total levels ratio of CAMKII (Figure 2d) and GSK 3 $\beta$  (Figure 2e). Interestingly, these effects were no more observed when rats were treated with PC which seem to dose-dependently and completely abolish them. Moreover, NFATc3 (Figure 2a) and ERK1/2 (Figure 2c), which expression levels were not altered in our aging model, presented significantly modified phosphorylation levels in high doses PC treated groups. In order to check whether control rat hearts are in a condition of severe disease, cardiac stress markers brain natriuretic peptide (BNP) and troponin were measured. No significant differences were observed for BNP plasma levels and troponin expression in all groups (Supplemental Figure 1a, b).

### **2.3 Chronic PC treatment discharges heart from age-associated inflammation impact**

Inflammation is a feature commonly observed in the aged heart (Wu *et al.*, 2014). Accordingly, semi-quantitative analysis of myocardial sections stained with hematoxylin-eosin revealed cardiomyocyte hypertrophy and interstitial inflammation in 17 month old control rats. Interestingly, PC induced a dose-dependent and significant impeding of these age-related

processes (Figure 3a, b). This was accompanied by a significant decrease of CRP and IL-6 plasma concentrations (Figure 3c), and a significant downregulation of P38 phosphorylation level (Figure 3d).

#### **2.4 Long term consumption of PC protects the heart from fibrogenesis occurring with age**

With the onset of advanced age, the heart becomes vulnerable to fibrosis (Biernacka and Frangogiannis, 2011). Accordingly, the percentage of fibrotic area in hearts of 17 month old control groups was significantly higher than in young (Figure 4a, b). This was evidenced by semi-quantitative analysis of myocardial sections stained with Masson's trichrome. PC drastically impeded this age-related fibrosis, even at the lowest tested concentration. In view of this, we assessed TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. TGF- $\beta$  plasma concentration was increased in control groups compared to young rats, an effect which was significantly inhibited in PC treated groups (Figure 4c).

These changes were further confirmed with assessment of cellular Smad2 and Smad3 imbalance. Figure 4d shows a significant increase in phospho-Smad2/Smad2 ratio in aged control groups versus young, an effect that was not present in 17 month old PC treated rats. As for Smad3, phospho-Smad3/Smad3 ratio underwent the same imbalance as compared to young and PC treated groups. (Figure 4d).

#### **2.5 Chronic PC treatment immunizes the heart from oxidative stress**

Cellular aging is characterized by increased ROS production, apoptosis and the accumulation of damaged proteins and organelles (Storz, 2006). Thus, we carried out TUNEL staining, i.e., terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling, to ascertain the extent of apoptotic cells in 17 month old hearts of control and PC treated rats. The percentage of TUNEL positive cells in control rats was significantly higher than that of young. PC dose-dependently

impeded this age-related increase, with no effect at 2.5 mg/kg but with significant reductions at 5, 10 and 20 mg/kg (Figure 5a, c). Immunohistochemical assessment for 8-OHdG, a critical biomarker of DNA damage (Valavanidis *et al.*, 2009), was also conducted to demonstrate its abundance in aging cardiac tissues and the inhibitory effect of PC. Indeed, increased immunostaining for 8-OHdG was evident in control groups versus PC treated rats (Figure 5b, d). Finally, expression of the antioxidant enzyme SOD1 was reduced in aged hearts, an effect no longer observed in the presence of PC at concentrations higher than 2.5 mg/kg (Figure 6a). Similarly, expression of the antioxidant enzyme SOD2 was significantly higher in PC5, PC 10 and PC 20 versus control groups (Figure 6b).

### 3. Discussion

Aging is a physiological process that affects the overall health status of the organism and is a leading risk factor for the development of cardiovascular diseases. Several studies have shown the beneficial effects of specific individual PC consumption on the heart (Rasines-Perea and Teissedre, 2017); however, no studies to our knowledge have evaluated the *in vivo* cardiac effects of chronic dietary doses of a PC mixture. Therefore, the aim of this work was to evaluate, for the first time, the long-term *in vivo* impact of a mixture of PC on age-associated cardiac remodeling.

Long-term consumption of PC preserved cardiac morphological and functional properties. At 17 month old, when compared to young rats, control groups revealed a marked increase in heart chamber and LVPWd, an effect which was not observed in PC treated groups (PC>2.5 mg/kg). Cardiac chambers remodeling are features of cardiac senescence within age (Lakatta and Levy, 2003). Some PC such as resveratrol and the synthetic flavonoid derivative S17834 have been demonstrated to exhibit beneficial effects against the development of cardiac chamber remodeling but in specific pathological conditions not related to aging (Thandapilly *et al.*, 2010; Qin *et al.*,

2012). Cardiac aging is also characterized by the decline of EF and FS (Boluyt *et al.*, 2004). We confirmed in our study this age effect on cardiac performance, while no significant decrement was observed in PC treated groups (PC>2.5 mg/kg). In other words, it seems that daily consumption of PC was able to protect the heart not only against age-related remodeling, but also against age-related decrease in cardiac functional performance.

Previous works showed an enhancement of cardiac hypertrophic signaling pathways in the aged heart, specifically, NFATc3/calcineurin (Dai *et al.*, 2009), ERK1/2 (Liao *et al.*, 2015), CAMKII (Nattel, 2018) and GSK 3 $\beta$  (Fallah *et al.*, 2011). Altogether, dephosphorylation of NFAT by calcineurin, phosphorylation of GSK 3 $\beta$ , CAMKII and ERK1/2 coordinate the cardiac hypertrophic response (Heineke and Molkentin, 2006). These effects were confirmed in our model. Interestingly, stimulation of these pathways is not necessarily associated with an increase in heart mass, as shown in our model where HW/TL ratio remained unchanged with age, but may depend on a balance between progressive myocyte dropout in aging and reactive myocyte hypertrophy accompanied with an increased collagen concentration (Anversa *et al.*, 1986; Olivetti *et al.*, 1991). Dolinsky *et al.* demonstrated that resveratrol was able to prevent stress-induced cardiac hypertrophy (Dolinsky *et al.*, 2015), but no studies have been undertaken on the long-term effect of dietary doses of PC on age-induced cardiac hypertrophy. Our results clearly show that PC concentrations were able to dose-dependently and significantly attenuate the age effect on key signaling regulators of cardiac hypertrophy.

Our findings also show a significant increase of plasma CRP and IL-6 as well as leucocyte infiltrates in the myocardium of control rats compared to PC treated ones, suggesting that chronic PC treatment discharged the heart from age-associated inflammation impact. CRP and IL-6 are plasma inflammatory markers that increase with aging heart (Franceschi and Campisi, 2014).

Usually, their secretion could be predictive of subsequent cardiovascular events such as acute coronary syndrome (Wang *et al.*, 2014). It has been demonstrated that resveratrol suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines in murine macrophages by modulating NF- $\kappa$ B signaling pathway (Ma *et al.*, 2015). Additionally, P38 kinase plays a central role in inflammation activated by stress and inflammatory cytokines (Roux and Blenis, 2004). Herein, the P38 inflammatory pathway was up-regulated in rat hearts conversely to that observed in PC treated groups (PC5, PC 10 and PC 20). This corroborated the results of histology and plasma inflammatory markers.

PC mixture consumption protected the heart from fibrogenesis in PC treated rats. Indeed, both, Smad 2 and Smad 3 activities were reduced in the myocardium, as well as TGF- $\beta$  plasma concentration. Furthermore, less percentage of fibrotic area was detected in the PC-treated myocardia compared to controls. Aging increases TGF- $\beta$  expression which plays an important role in the synthesis and secretion of collagen by cardiac fibroblasts; thus, contributing to cardiac stiffening (Nakou *et al.*, 2016). Kaempferol and PC of a yacon plant were shown to alleviate respectively myocardial fibrosis in angiotensin II-induced cardiac dysfunction and in diabetic rat model (Liu *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2018). Nevertheless, these experiments were undergone in pathological conditions not related to normal aging. In the present work, we reveal that long-term PC consumption impeded the impact of aging process on cardiac fibrosis in a dose-dependent manner.

Finally, concomitant with fibrosis, cellular aging is characterized by increased ROS production, apoptosis and accumulation of damaged proteins and organelles (Storz, 2006). In the present work, apoptotic myocytes were remarkably reduced in PC treated groups when compared to control, with an increased expression of anti-oxidant enzymes SOD 1 and SOD 2. Long-term oxidative stress has been linked to various diseases, especially cardiovascular ones (Petersen and Smith, 2016).

The mechanism of cardiac hypertrophy prevention by flavonoids has been suggested to be related to the regression of cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress (Sheng *et al.*, 2009). In our model, the observed beneficial effects of PC on age-induced cardiac remodeling might be likely due to their antioxidant properties. Enhancement in SOD 1 and SOD 2 counterbalances ROS production in cardiac tissue and therefore abrogates myocardial injuries.

In conclusion, our findings pinpoint for the first time that a long-term daily consumption of PC preserves cardiac morphology and performance with less hypertrophy, inflammation, fibrosis and cardiomyocyte apoptosis. These results might propose an effective nutritional intervention for cardiac protection during aging.

#### **4. Experimental procedures**

##### **4.1 Characterization of Phenolic compounds mixture**

The grape pomace byproducts used in this work are the solid remains of grapes obtained in wine industries after the pressing step. They contain the skins, pulp, seeds, and stems of the fruit. We used three different grape types: Cabernet Sauvignon, Marselan and Syrah. The corresponding byproducts were stored at -20 °C until use. Once defrosted at room temperature, PC extraction and characterization were performed as previously described (Chacar *et al.*, 2018). Briefly, the PC were extracted from grape pomace extracts via a solid liquid extraction then the solutions were spray dried and we obtained a powder consisting of a pure mixture of PC. Total PC contained in the powder were quantified using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay against a standard curve of gallic acid and expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g of the final powder (Singleton *et al.*, 1999). The free radical scavenging capacity (AC) of the powder was measured by means of the DPPH assay (Brand-Williams *et al.*, 1995). The DPPH value of the extracts was expressed in micromolar Trolox equivalent per milliliter ( $\mu$ MTE). High performance liquid chromatography

(HPLC) analyses was conducted for the identification and quantification of PC from grape pomace extracts. The HPLC-DAD analyses were carried out with an HPLC system (Waters Alliance, USA) equipped with a quaternary Waters e2695 pump. The method was adapted based on the review by (Khoddami *et al.*, 2013). The results of Folin-Ciocalteu analysis showed that the final powder contains 920 mg/g of PC (92% of the total mass of the powder). The left 8% are residual sugars and other not determined compounds co-extracted with PCs. High free radical scavenging capacity of grape pomace extract consists of 6028  $\mu$ MTE equivalent to 92 % of inhibition of free radicals. As for the HPLC results, eight compounds were detected (Malvidin: 42 mg/g of powder; delphinidin: 27.8; rutin hydrate: 5.8; quercetin: 3.4; catechin: 0.8; coumaric acid: 0.75; kaempferol: 0.39 and trans-cinnamic acid: 0.17).

#### **4.2 Animals and diets**

The present study was approved by the Ethical Committee of the Saint Joseph University of Beirut. The protocols were designed according to the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the Council of the American Physiological Society and were in adherence to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and according to the European Parliament Directive 2010/63 EU. Forty-four male adult Wistar rats were used. The animals were kept at a stable temperature ( $22 \pm 3$  °C) and humidity ( $50 \pm 5\%$ ) and were exposed to 12:12 h light-dark cycle. They were fed ordinary rodent chow and were acclimatized at least one week under these conditions before the start of the study. The treatment was conducted for 14 months. The rats were divided into 6 groups randomly: Four treated groups (n=8 per group) with different concentrations of PC (2.5 mg/kg/day, 5 mg/kg/day, 10 mg/kg/day and 20 mg/kg/day diluted in the drinking water plus 0.1 % DMSO); one group SHAM (n=6) and one group control (0.1 % DMSO, n=6). The

concentrations of PC were calculated and administered to the rats following the quantification of these compounds found in the powder as obtained by Folin-Ciocalteu method in order to obtain the exact final amount 2.5, 5, 10 and 20 mg/kg/day. Adjustments of the PC doses were made every one month according to the rat weights, in order to maintain a stable intake.

### **4.3 Electrocardiographic study**

Transthoracic echocardiography was performed every 3 months using the SonoScape SV2 high resolution ultrasound system equipped with a 10MHz probe. Rats were sedated by intra-peritoneal injection with ketamine (Ilium, Australia; 75 mg/kg) and xylazine (Interchemie, Holland; 10 mg/kg). Left ventricular (LV) parasternal long axis 2D view in M-mode was performed at the level of papillary muscle to assess LV wall thicknesses and internal diameters, allowing the calculation of the fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) by the Teicholz method. EF (%) was calculated using the following formula:  $EF = (EDV - ESV)/EDV * 100$ ; EDV: End diastolic volume and ESV: End systolic volume. FS (%) was calculated based on the diameters of the left ventricle:  $FS = (LVIDd - LVIDs)/LVIDd * 100$ .

### **4.4 Histological analyses**

For sacrifice, animals were anesthetized with the same ketamine/xylazine mixture and pedal withdrawal reflex was performed to make sure of adequate depth of anesthesia. When animals were completely non-responsive to toe pinching, their hearts were removed, weighted and perfused with ice-cold Tyrode solution until all blood was removed, then cut into half through a mid-sagittal plane. One half was kept at -80°C for protein extraction whereas the other half fixed in 10% formalin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The formalin-fixed tissue was



embedded in paraffin, and sections of 5 µm thickness were cut. Paraffin-embedded sections of the hearts were stained with either hematoxylin eosin or Masson's trichrome for histopathological evaluation (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). After staining, the sections were rinsed in distilled water, dehydrated in ethanol/water baths with decreasing water content, and finally rinsed in xylene before being mounted with a permanent mounting medium. Histological examinations were performed by two independent pathologists blinded to the conditions. Six or eight sections were analyzed for each group. A semi-quantitative scoring system was used to assess interstitial changes such as inflammation and fibrosis. Furthermore, RNA/DNA oxidative damage assay was conducted using immunofluorescence on heart sections with an antibody (8-OHdG) that recognizes 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (Abcam, Cambridge, UK). Staining was performed after triton permeabilization and saturation with goat serum and bovine serum albumin. Nuclei were co-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *In situ* apoptosis detection kit (Abcam, Cambridge, UK) was also used to recognize apoptotic nuclei in heart sections. Fibrosis and apoptosis analyses were done with the Image J program, by thresholding the acquired pictures, then creating selections of the fibrotic and apoptotic areas; 8-OHdG/DAPI positive cells were also counted.

#### **4.5 Protein measurement and western blotting**

Protein concentrations were measured by the Bradford method using bovine serum albumin as standard (BioRad, USA). Protein samples (100 µg) were separated in a vertical electrophoresis system that worked at 100 volts (V). Once the electrophoresis was completed, the gel was removed and then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad laboratories Inc., Irvine, CA, USA) under electrophoretic conditions (80 V, 400 mA, 2h30). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in TBS-Tween blocking solution (in mmol/l: Tris-HCl

100, NaCl 150 and Tween-20 0.1 %) with 5 % BSA or 5% nonfat dry milk. The blots were then incubated overnight with gentle agitation at 4°C with primary antibodies: NFATc3 (Santa-Cruz Biotechnology, Dallas-Texas, USA; 1/500), phospho-Ser165 NFATc3 (p-NFATc3) (Abcam, Cambridge, UK; 1/500), PP2B-A $\beta$  (C-20) (Santa-Cruz Biotechnology, Dallas-Texas, USA; 1/1000), SOD1 (Abcam, Cambridge, UK; 1/2000), SOD2 (Abcam, Cambridge, UK; 1/4000), Smad2 (Abcam, Cambridge, UK; 1/500), phospho-S467 Smad2 (p-Smad2) (Abcam, Cambridge, UK; 1/500), Smad3 (Abcam, Cambridge, UK; 1/1000), phospho-S423+S425 Smad3 (p-Smad3) (Abcam, Cambridge, UK; 1/1000), pan-CAMKII (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), pan-phospho CAMKII (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), Troponin I (C-4) (Santa-Cruz Biotechnology, Dallas-Texas, USA; 1/500), GSK 3 $\beta$  (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), phospho-GSK 3 $\beta$  (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), ERK1/2 (Abcam, Cambridge, UK; 1/1000), phospho-ERK 1/2 (Abcam, Cambridge, UK; 1/10000), P38 (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), phospho-Thr180/Tyr182 P38 (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000), Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1) (Cell signaling Technology, Massachusetts, USA; 1/1000) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Abcam, Cambridge, UK; 1/2500 for all). The following day, the membranes were washed in TBST five times, 5 min each before incubation for 1 h at room temperature with specific anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (BioRad laboratories, CA, USA) Membranes were revealed with ECL chemiluminescent substrate (BioRad laboratories, Inc., USA). Signal intensities of bands in the immunoblots were quantified using ImageJ analysis software. Three western blots were performed for each protein and condition.

#### **4.6 Assessment of plasma levels of IL-6, CRP, TGF- $\beta$ and BNP**

Blood samples were collected, on the time of sacrifice, in EDTA tubes from control and treated rats. Plasma samples were obtained by centrifugation at 4500 rpm for 10 min, then aliquoted and stored at -80 °C until analysis. All plasma parameters measurements were done by the ELISA technique: TGF- $\beta$  (Rat) kit, IL-6 (Rat) kit, CRP (Rat) kit and BNP-32 Rat kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer protocols.

#### **4.7 Statistical analysis**

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM for the number of samples indicated in the figure legends. One-way ANOVA or two-way ANOVA were used to test for significance between groups. Student–Newman–Keuls post-hoc test was applied for multiple pairwise comparisons. Statistics were analyzed using SigmaPlot Software (version 12.5). Significance was set below 0.05 for all analysis.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Research Council of Saint Joseph University of Beirut, Projects FS93 and FM281.

#### **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

SC, JFF and NF designed the research, performed experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. JH and YS performed experiments and helped for data analysis. PB and NL helped for data acquisition. RGM, helped in designing the research and reviewed the manuscript. All authors discussed the results and approved the final version of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

## References

- Anversa, P., Hiler B., Ricci R., Guideri G., Olivetti G. (1986). Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *Journal of the American College of Cardiology*. **8**, 1441-1448.
- Azevedo, P. S., Polegato B. F., Minicucci M. F., Paiva S. A., Zornoff L. A. (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. **106**, 62-69. <https://10.5935/abc.20160005>
- Biernacka, A., Frangogiannis N. G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and disease*. **2**, 158-173.
- Boluyt, M. O., Converso K., Hwang H. S., Mikkor A., Russell M. W. (2004). Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. *Journal of applied physiology*. **96**, 822-828. <https://10.1152/jappphysiol.01026.2003>
- Brand-Williams, W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci.Technol*. **28**, 25-30.
- Chacar, S., Itani T., Hajal J., Saliba Y., Louka N., Faivre J. F., Maroun R., Fares N. (2018). The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. *Journal of food science*. **83**, 246-251. <https://10.1111/1750-3841.14006>
- Conforti, F., Sosa S., Marrelli M., Menichini F., Statti G. A., Uzunov D., Tubaro A., Menichini F., Loggia R. D. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*. **116**, 144-151. <https://10.1016/j.jep.2007.11.015>
- Dai, D. F., Chen T., Johnson S. C., Szeto H., Rabinovitch P. S. (2012). Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. **16**, 1492-1526. <https://10.1089/ars.2011.4179>
- Dai, D. F., Santana L. F., Vermulst M., Tomazela D. M., Emond M. J., MacCoss M. J., Gollahon K., Martin G. M., Loeb L. A., Ladiges W. C., Rabinovitch P. S. (2009). Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation*. **119**, 2789-2797. <https://10.1161/CIRCULATIONAHA.108.822403>
- Dolinsky, V. W., Soltys C.-L. M., Rogan K. J., Chan A. Y. M., Nagendran J., Wang S., dyck J. R. B. (2015). Resveratrol prevents pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. **93**, 413-425. <https://DOI 10.1007/s00109-014-1220-8>
- dos Santos, K. C., Cury S. S., Rodrigues Ferraz A. C., Corrente J. E., Gonçalves B. M., de Araújo Machado L. H., Carvalho R. F., Nakamune A. S., Fabro A. T., Freire P. P., Corrêa C. R. (2018). Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://https://doi.org/10.1155/2018/182135>

- Fallah, M. P., Chelvarajan R. L., Garvy B. A., Bondada S. (2011). Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors. *Mechanisms of ageing and development*. **132**, 274-286. <https://10.1016/j.mad.2011.05.003>
- Franceschi, C., Campisi J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. **69 Suppl 1**, S4-9. <https://10.1093/gerona/glu057>
- Gyongyosi, M., Winkler J., Ramos I., Do Q. T., Firat H., McDonald K., Gonzalez A., Thum T., Diez J., Jaisser F., Pizard A., Zannad F. (2017). Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *European journal of heart failure*. **19**, 177-191. <https://10.1002/ejhf.696>
- Hanhineva, K., Torronen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*. **11**, 1365-1402. <https://10.3390/ijms11041365>
- Heineke, J., Molkentin J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **7**, 589-600. <https://10.1038/nrm1983>
- Horn, M. A., Trafford A. W. (2016). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. **93**, 175-185. <https://10.1016/j.yjmcc.2015.11.005>
- Khoddami, A., Wilkes M. A., Roberts T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. **18**, 2328-2375. <https://10.3390/molecules18022328>
- Khurana, S., Venkataraman K., Hollingsworth A., Piche M., Tai T. C. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*. **5**, 3779-3827. <https://10.3390/nu5103779>
- Kim, H., Hwang J. S., Woo C. H., Kim E. Y., Kim T. H., Cho K. J., Kim J. H., Seo J. M., Lee S. S. (2008). TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Experimental & molecular medicine*. **40**, 167-175. <https://10.3858/emm.2008.40.2.167>
- Kubin, A. M., Skoumal R., Tavi P., Konyi A., Perjes A., Leskinen H., Ruskoaho H., Szokodi I. (2011). Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility. *Journal of molecular and cellular cardiology*. **50**, 884-893. <https://10.1016/j.yjmcc.2011.02.005>
- Lakatta, E. G., Levy D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. **107**, 490-497.
- Liao, P. H., Hsieh D. J., Kuo C. H., Day C. H., Shen C. Y., Lai C. H., Chen R. J., Padma V. V., Kuo W. W., Huang C. Y. (2015). Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget*. **6**, 35383-35394. <https://10.18632/oncotarget.6168>
- Liu, Y., Gao L., Guo S., Liu Y., Zhao X., Li R., Yan X., Li Y., Wang S., Niu X., Yao L., Zhang Y., Li L., Yang H. (2017). Kaempferol Alleviates Angiotensin II-Induced Cardiac Dysfunction and Interstitial Fibrosis in Mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. **43**, 2253-2263. <https://10.1159/000484304>

- Lopez-Candales, A., Hernandez Burgos P. M., Hernandez-Suarez D. F., Harris D. (2017). Linking Chronic Inflammation with Cardiovascular Disease: From Normal Aging to the Metabolic Syndrome. *Journal of nature and science*. **3**.
- Ma, C., Wang Y., Dong L., Li M., Cai W. (2015). Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF-kappaB and JAK/STAT signaling pathways. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. **47**, 207-213. <https://10.1093/abbs/gmu135>
- Martin-Fernandez, B., Gredilla R. (2016). Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age*. **38**, 225-238. <https://10.1007/s11357-016-9933-y>
- Moris, D., Spartalis M., Spartalis E., Karachaliou G. S., Karaolanis G. I., Tsourouflis G., Tsilimigras D. I., Tzatzaki E., Theocharis S. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of translational medicine*. **5**, 326. <https://10.21037/atm.2017.06.27>
- Mudd, J. O., Kass D. A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*. **451**, 919-928. <https://10.1038/nature06798>
- Nakou, E. S., Parthenakis F. I., Kallergis E. M., Marketou M. E., Nakos K. S., Vardas P. E. (2016). Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *International journal of cardiology*. **209**, 167-175. <https://10.1016/j.ijcard.2016.02.039>
- Nattel, S. (2018). Aging and Protein Kinase Activation: Is It the Missing Link Between Age and Atrial Fibrillation? *Circulation research*. **122**, 799-801. <https://DOI:10.1161/CIRCRESAHA.118.312786>
- Olivetti, G., Melissari M., Capasso J. M., Anversa P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research*. **68**, 1560-1568.
- Petersen, K. S., Smith C. (2016). Ageing-Associated Oxidative Stress and Inflammation Are Alleviated by Products from Grapes. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **2016**, 6236309. <https://10.1155/2016/6236309>
- Qin, F., Siwik D. A., Luptak I., Hou X., Wang L., Higuchi A., Weisbrod R. M., Ouchi N., Tu V. H., Calamaras T. D., Miller E. J., Verbeuren T. J., Walsh K., Cohen R. A., Colucci W. S. (2012). The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circulation*. **125**, 1757-1764, S1751-1756. <https://10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067801>
- Rasines-Perea, Z., Teissedre P. L. (2017). Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules*. **22**. <https://10.3390/molecules22010068>
- Richter, K., Kietzmann T. (2016). Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell and tissue research*. **365**, 591-605. <https://10.1007/s00441-016-2445-3>
- Roux, P. P., Blenis J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. **68**, 320-344. <https://10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Sheng, R., Gu Z. L., Xie M. L., Zhou W. X., Guo C. Y. (2009). EGCG inhibits proliferation of cardiac fibroblasts in rats with cardiac hypertrophy. *Planta medica*. **75**, 113-120. <https://10.1055/s-0028-1088387>

- Singleton, V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *METHODS IN ENZYMOLOGY*. **299**.
- Steenman, M., Lande G. (2017). Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophysical reviews*. **9**, 131-137. <https://10.1007/s12551-017-0255-9>
- Storz, P. (2006). Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. **2006**, re3. <https://10.1126/stke.3322006re3>
- Thandapilly, S. J., Wojciechowski P., Behbahani J., Louis X. L., Yu L., Juric D., Kopilas M. A., Anderson H. D., Netticadan T. (2010). Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *American journal of hypertension*. **23**, 192-196. <https://10.1038/ajh.2009.228>
- Valavanidis, A., Vlachogianni T., Fiotakis C. (2009). 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. **27**, 120-139. <https://10.1080/10590500902885684>
- Varzakas, T., Zakyntinos G., Verpoort F. (2016). Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods*. **5**. <https://10.3390/foods5040088>
- Vergara, C., von Baer D., Mardones C., Wilkens A., Wernekinck K., Damm A., Macke S., Gorena T., Winterhalter P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem*. **60**, 929-933.
- Wang, X. H., Liu S. Q., Wang Y. L., Jin Y. (2014). Correlation of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome. *Genetics and Molecular Research*. **13**. [https://DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2014.June.9.11>](https://DOI http://dx.doi.org/10.4238/2014.June.9.11)
- WHO (2017). Cardiovascular disease statistics
- Wu, J., Xia S., Kalionis B., Wan W., Sun T. (2014). The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *BioMed research international*. **2014**, 615312. <https://10.1155/2014/615312>
- Zhao, Q. D., Viswanadhapalli S., Williams P., Shi Q., Tan C., Yi X., Bhandari B., Abboud H. E. (2015). NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFkappaB signaling pathways. *Circulation*. **131**, 643-655. <https://10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011079>

Figures

Figure 1

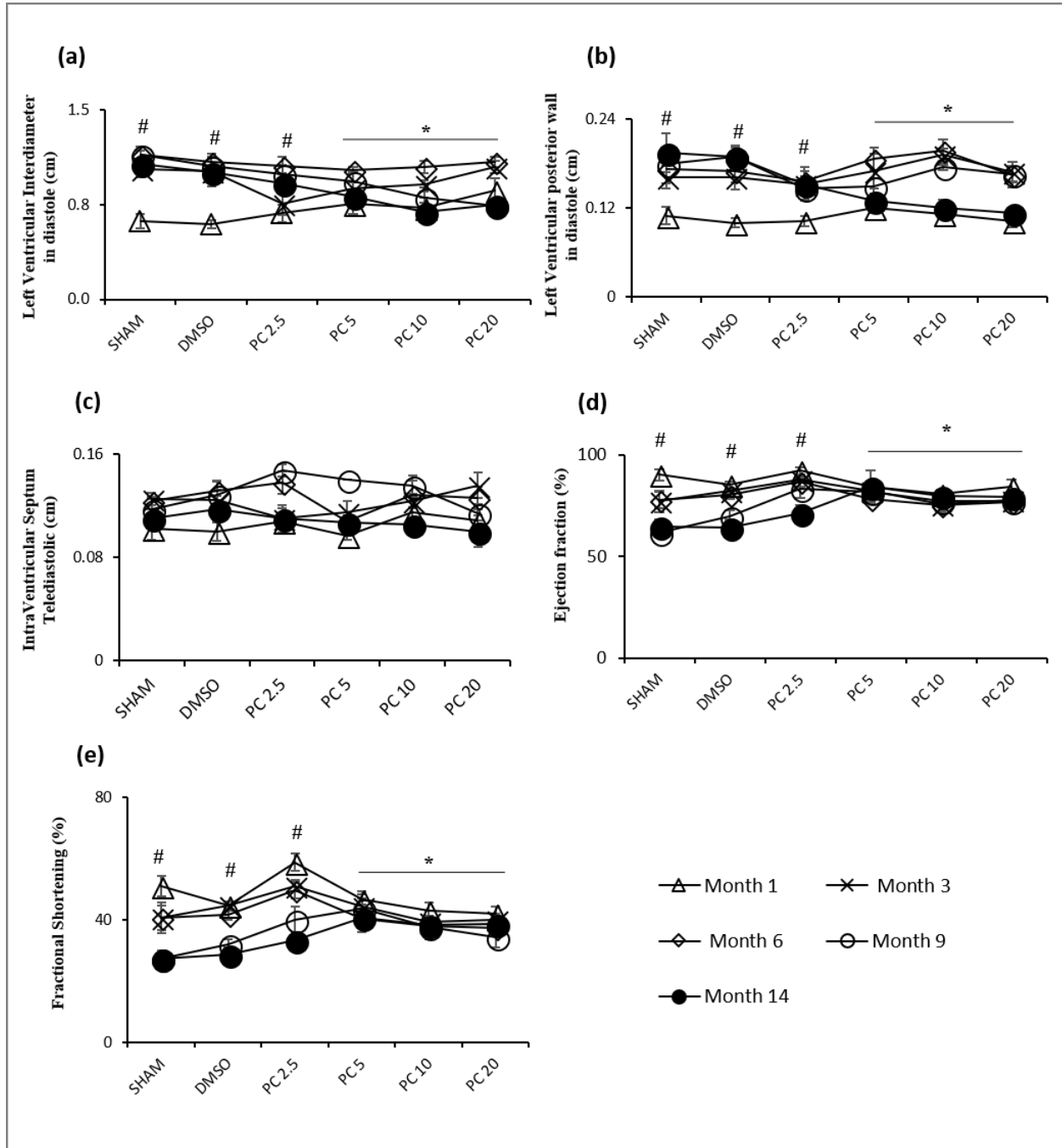




Figure 2

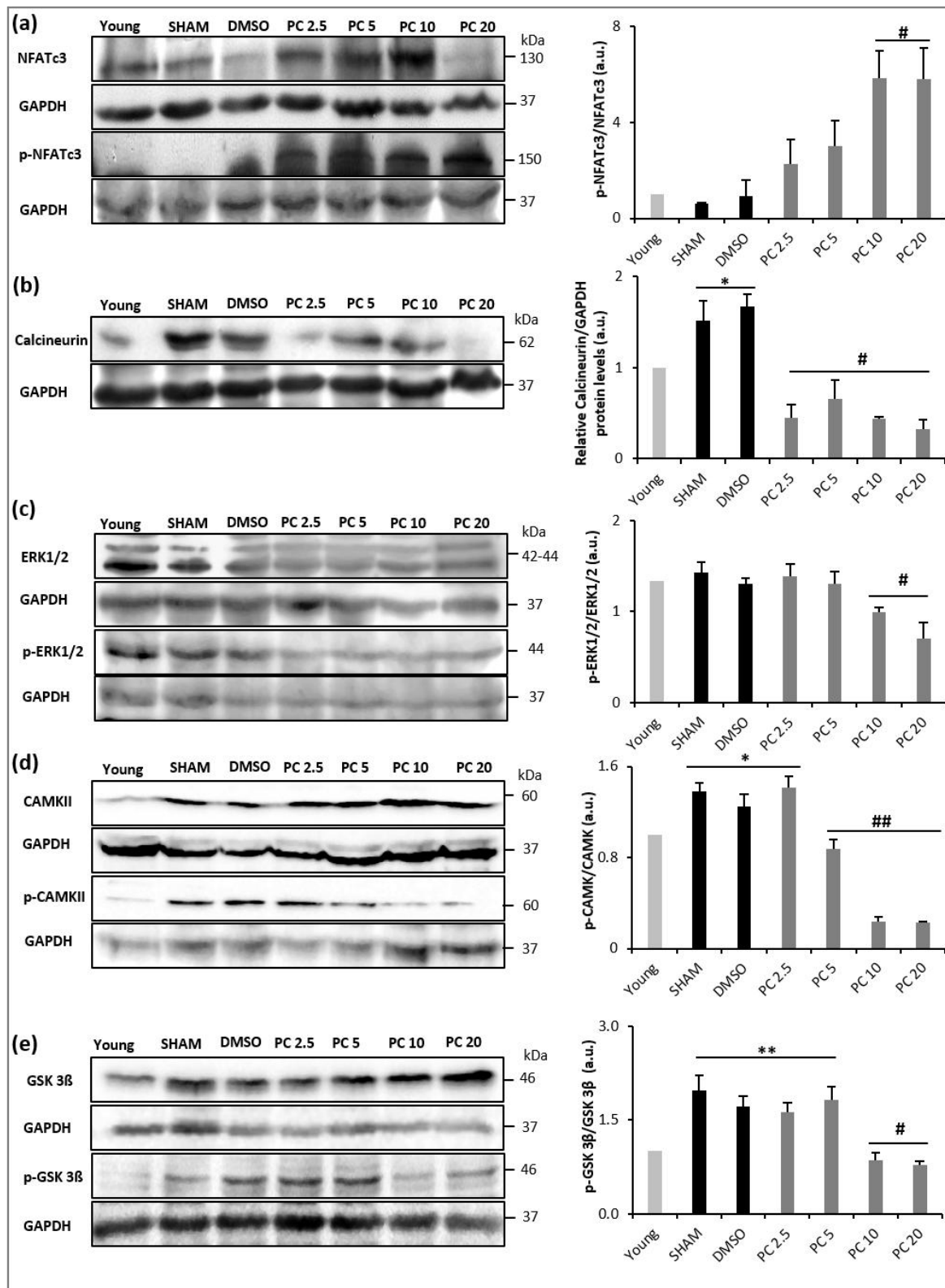


Figure 3

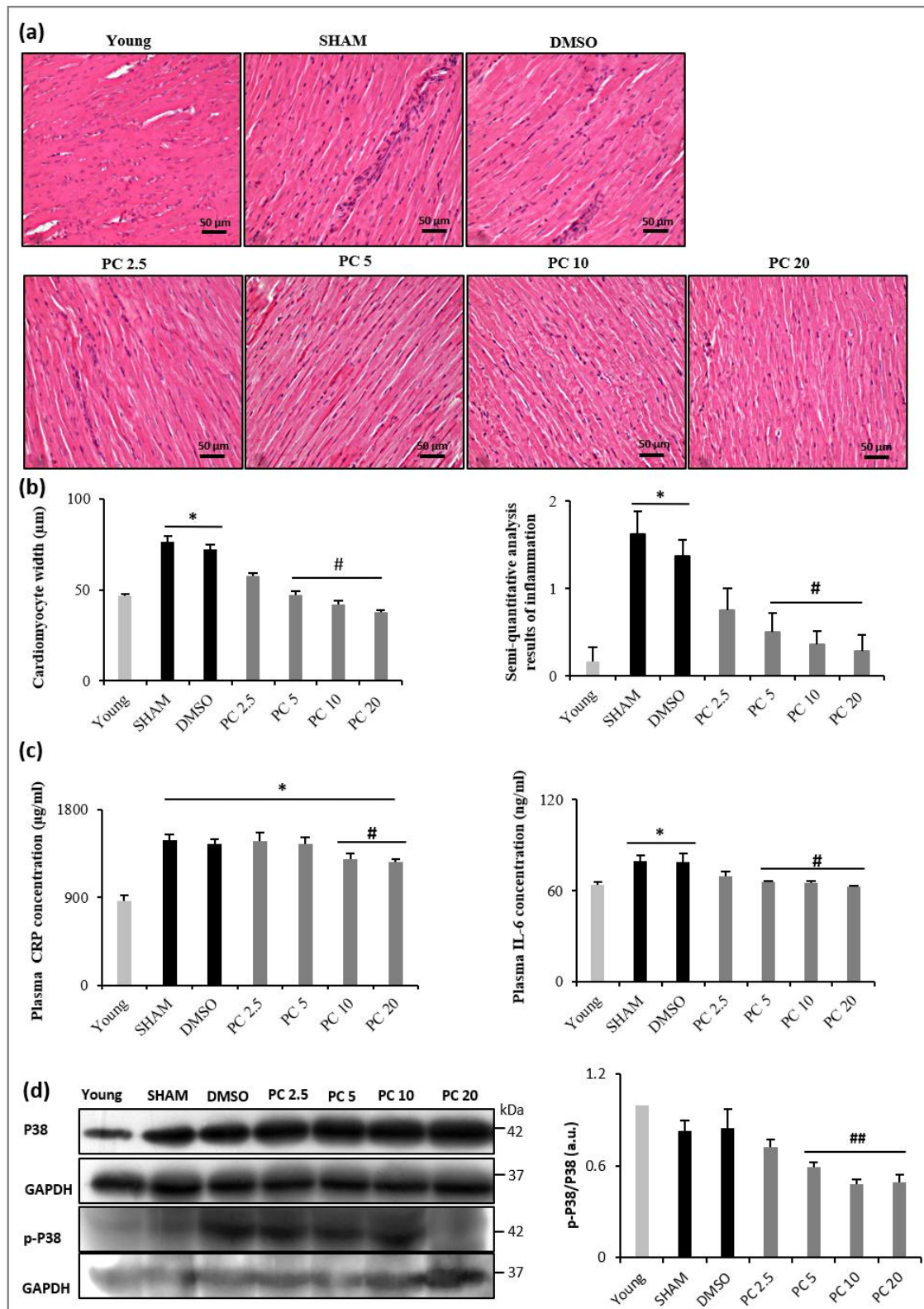


Figure 4

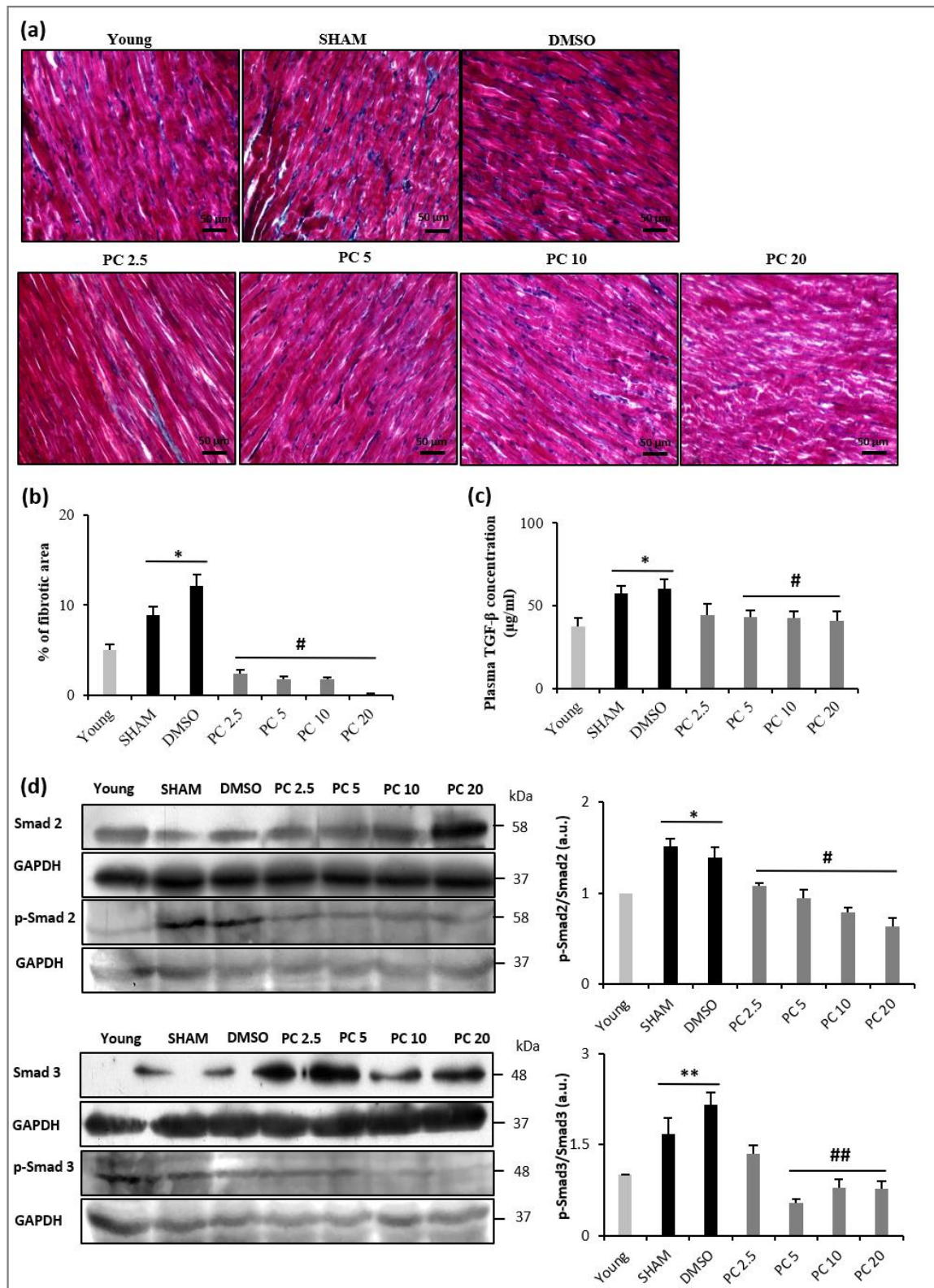


Figure 5

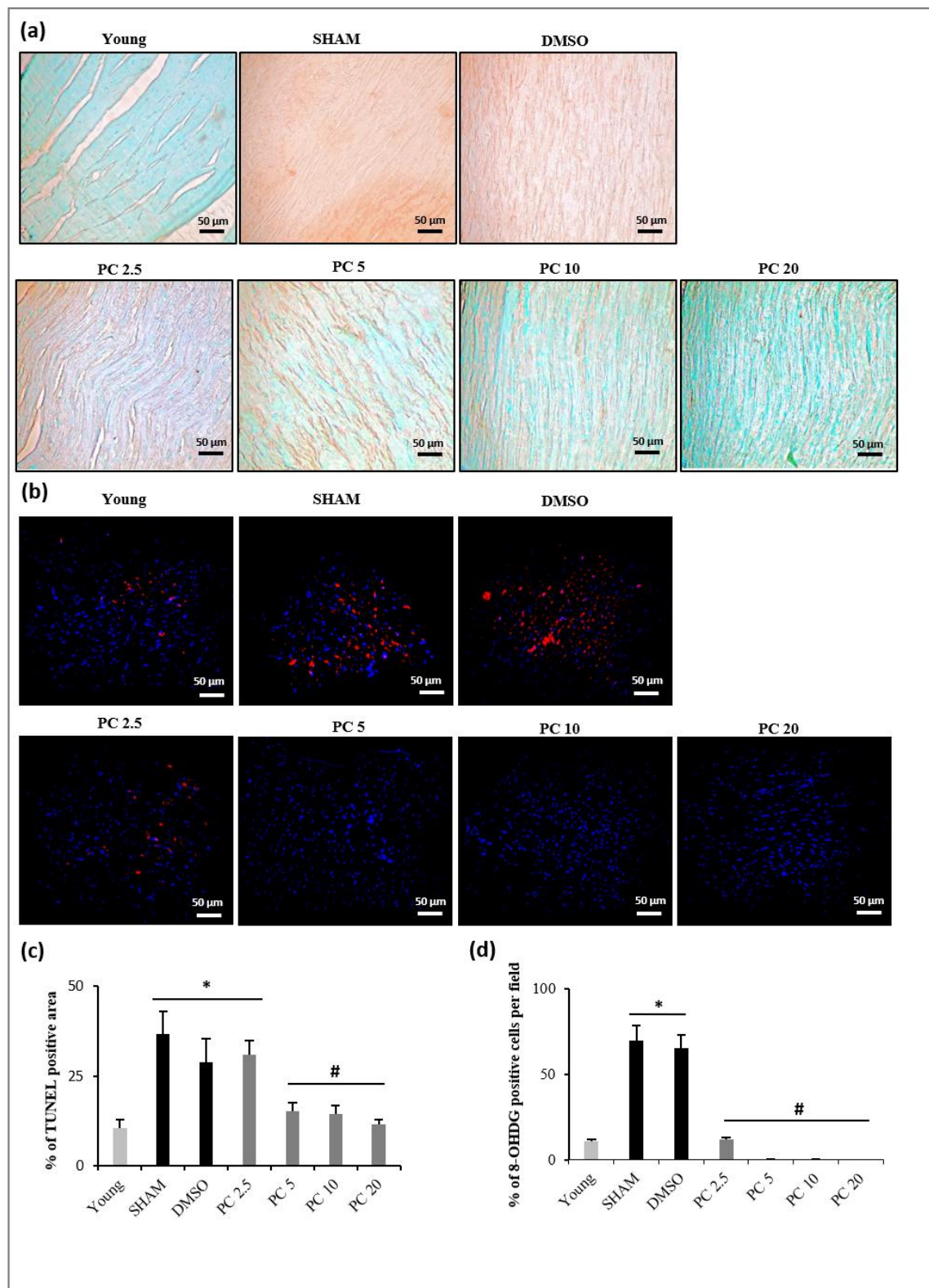


Figure 6

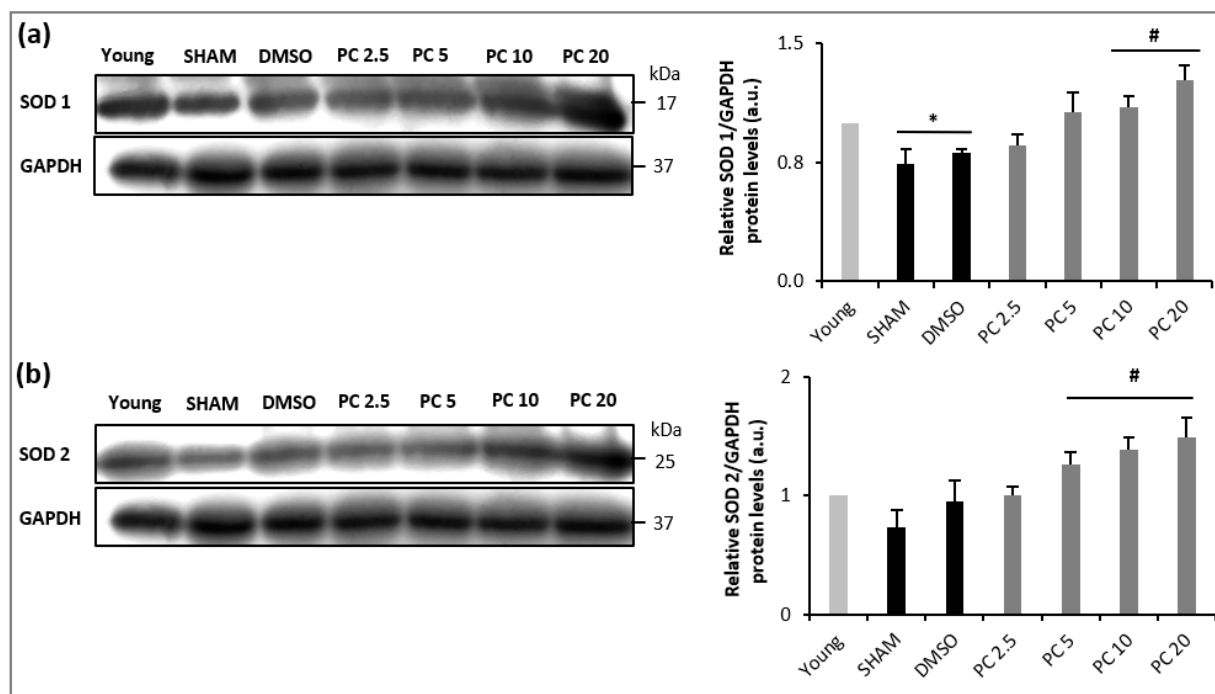


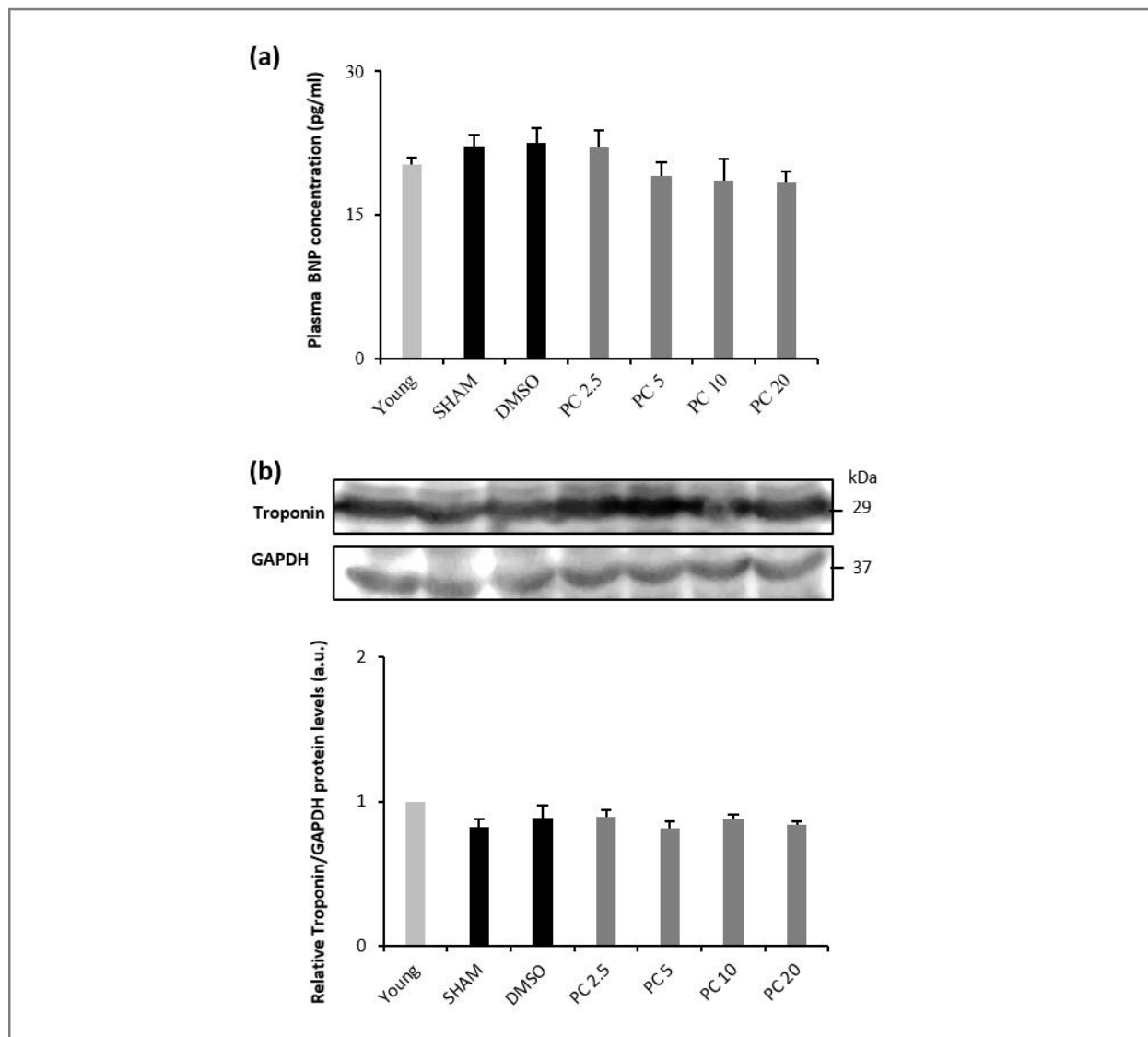
Table 1. Characteristics of aged rat hearts in control and treated groups.

	Young	SHAM	DMSO	PC 2.5	PC 5	PC 10	PC 20
<b>HW/BW</b> (mg/g)	2.74 ± 0.12	2.73 ± 0.07	2.74 ± 0.09	2.9 ± 0.1	3.05 ± 0.04	2.85 ± 0.15	2.75 ± 0.07
<b>HW/TL</b> (mg/mm)	22.08 ± 1.49	32.31 ± 0.77 *	31.3 ± 1.17 *	35.33 ± 2.09 *	35.79 ± 1.66 *	35.5 ± 1.38 *	33.54 ± 1.17 *

Values are means ± SEM; BW: body weight; HW: heart weight.

\**p* < 0.001 compared to the Young group.

Supplemental Figure 1



### Figure legends

**Figure 1. Dose-dependent recovery by phenolic compounds of age-related hypertrophy observed by echocardiography.** Left ventricular chamber and cardiac performance were over 14 months with or without PC or DMSO. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. (a) LVIDd, (b) LVPWd, (c) IVSTd, (d) EF and (e) FS. For SHAM-DMSO rats: n=6/group, and treated rats with PC: n=8/group. #  $p < 0.05$ , time effect within each group (Month 14 vs Month 1). \*  $p < 0.05$ , effect of treatment after 14 months vs. SHAM and DMSO). PC 2.5 = phenolic compounds at 2.5 mg/kg/day; PC 5 = phenolic compounds at 5 mg/kg/day; PC 10 = phenolic compounds at 10 mg/kg/day; PC 20 = phenolic compounds at 20 mg/kg/day.

**Figure 2. Modulation of age-induced cardiac remodeling by phenolic compounds consumption.** Representative Western blot (left) and histograms analyses (right) for NFAT (a), calcineurin (b), ERK1/2 (c), CAMKII (d) and GSK 3 $\beta$  (e) in rat cardiac tissue, normalized to GAPDH (in arbitrary units, a.u.). Values represent mean  $\pm$  SEM (n=3 for each protein and condition). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  vs. young, #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  vs. SHAM and DMSO. PC x = phenolic compounds at x mg/kg/day.

**Figure 3. Dose-dependent reduction of age-related cardiac inflammation by phenolic compounds.** (a) Representative microphotographs of left ventricular sections of the heart stained with hematoxylin-eosin showing Young, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 and PC 20 groups. (b) Histograms showing cardiomyocytes width ( $\mu$ m) and semi-quantitative scores of inflammation (n=6-8 per group). (c) CRP and IL-6 plasma concentrations in all groups (n=6-8 per group). (d) Representative Western blot analyses for p38 in rat cardiac tissue, normalized to GAPDH (in arbitrary units, a.u.) (n=3 for each protein and condition). \*  $p < 0.05$  vs. young and #  $p < 0.05$  vs. SHAM and DMSO. Results are mean  $\pm$  SEM. PC x = phenolic compounds at x mg/kg/day.

**Figure 4. Dose-dependent regression of fibrosis related to advanced age by phenolic compounds consumption.** Quantification of interstitial fibrosis by Masson's trichrome staining of the left ventricle from SHAM, DMSO and PC treated rats. (a) Collagen accumulation is shown in blue color. The control rat hearts (SHAM and DMSO) show increased interstitial fibrosis

compared to the PC rat hearts. (b) Histogram showing percentage of fibrotic area (n=6-8 per group). (c) TGF- $\beta$  plasma concentrations in all groups (n=6-8 per group). (d) Representative western blot (left) and histograms analyses (right) for Smad2 and Smad3 (n=3 for each protein and condition) in rat cardiac tissue, normalized to GAPDH (in arbitrary units, a.u.). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  vs. young and #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  vs. SHAM and DMSO. Results are mean  $\pm$  SEM. PC x = phenolic compounds at x mg/kg/day.

**Figure 5. Dose-dependent inhibition of apoptosis and DNA/RNA oxidative damage in PC treated rat cardiac tissues.** Representative images of TUNEL (a) and 8-OHdG immunohistochemistry (b) in hearts obtained from Young, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 and PC 20 groups. (c) Quantification of percentage of TUNEL positive areas. (d) % of 8-OHdG positive cells. n=6-8 per group. Values are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  and #  $p < 0.05$  represent the comparison between all groups. PC x = phenolic compounds at x mg/kg/day.

**Figure 6. Dose-dependent restoration by phenolic compounds of reduced activity of (SOD) 1 and 2 in SHAM, DMSO and PC2.5.** Western blot detection of SOD1 and SOD2 from cardiac tissue of control and PC treated rats, normalized to GAPDH (in arbitrary units, a.u.) (n=3 for each protein and condition). \*  $p < 0.05$  vs. young and #  $p < 0.05$  vs. SHAM and DMSO.

### Supplemental figures legends

**Supplemental figure 1: Absence of heart failure in all control and experimental groups.** (a) BNP plasma levels in all groups of animals (n=6-8 per group). (b) Representative Western blot (left) and histograms analyses (right) for troponin in rat cardiac tissue, normalized to GAPDH (in arbitrary units, a.u.) (n=3 for each protein and condition). PC x = phenolic compounds at x mg/kg/day.



### 3 Etude de l'effet aigu des CP sur les propriétés électrophysiologiques des fibroblastes cardiaques

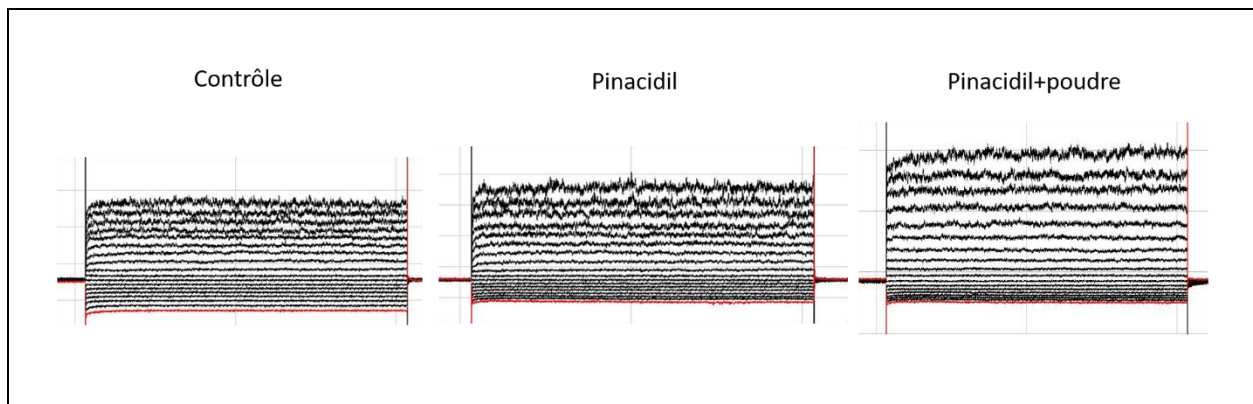
De nombreuses expériences ont été conduites en aigu afin de déterminer si les CP étaient capables d'influencer les propriétés électrophysiologiques, la prolifération, la différenciation et la sécrétion de fibroblastes cardiaques ventriculaires. Malheureusement, les cultures de ces cellules ont été particulièrement difficiles et n'ont pas permis d'obtenir de résultats véritablement exploitables. Nous avons choisi de ne présenter ici que le résultat extrêmement préliminaire qui a été obtenu sur le courant potassique activé par le pinacidil.

En effet, après analyse de l'effet de la poudre riche en CP en chronique sur le système cardiaque, nous nous sommes intéressés également à tester son effet, en aigu, sur certaines caractéristiques électrophysiologiques des fibroblastes cardiaques de rat en culture au cours de leur différenciation en myofibroblastes par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

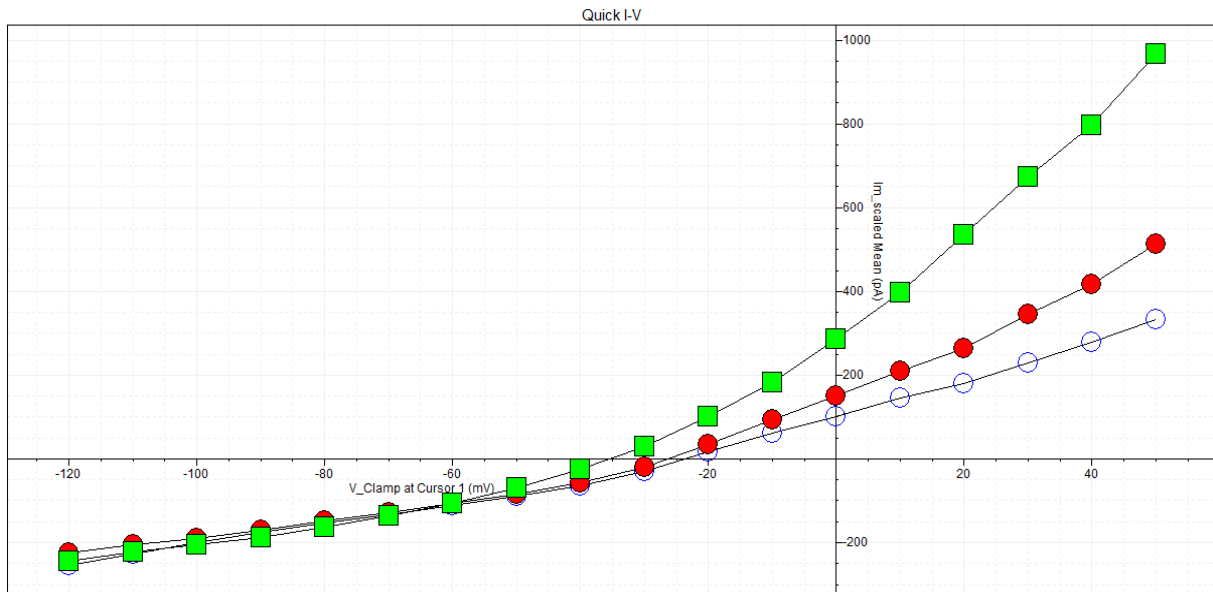
Nous n'avons pas été capables d'enregistrer le canal sodique activé par le potentiel décrit par (Chatelier *et al.*, 2012) sur les fibroblastes auriculaires humains, et ce jusqu'à des temps de culture dépassant 16 jours suffisants pour que se produise spontanément une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Nous avons ainsi focalisé notre intérêt sur les canaux potassiques Sur2/K<sub>ir</sub>6.1 décrits par Benamer et collaborateurs (Benamer *et al.*, 2009; Benamer *et al.*, 2011) et avons reproduit les conditions d'activation de ces courants. Même sur ce courant, les résultats obtenus restent extrêmement préliminaires.

Nous avons utilisé le pinacidil à 100  $\mu$ M comme activateur du courant. Les tracés de courants bruts représentés sur la **figure R2**, ont été obtenus en appliquant des dépolarisations d'une seconde entre -120 mV et + 50 mV par incréments de 10 mV. Ces enregistrements de courant obtenus après 12 jours de culture montrent que le pinacidil active un courant porté par un ion dont le potentiel d'inversion est négatif et présentant une légère rectification sortante (**Figure R3**). Ce courant ressemble à celui décrit dans les études de Benamer *et al.* (Benamer *et al.*, 2009; Benamer *et al.*, 2011) et nous amène à postuler qu'il s'agit bien d'un courant de type SUR2/Kir6.1. Il serait nécessaire toutefois de vérifier sa sensibilité au glibenclamide pour attester qu'il s'agit bien d'un courant de type KATP fibroblastique.

Lorsque le courant activé par le pinacidil est stabilisé, 500  $\mu\text{M}$  de poudre de CP provoquent une augmentation de ce courant (**Figures R2 et R3**). Cette augmentation du courant pinacidil a été obtenue dans 8 expériences mais la qualité des courants enregistrés ne nous permet pas de conduire une analyse globale de l'ensemble des résultats obtenus. En revanche, sur les 27 expériences où cela a été essayé, les CP n'ont jamais été capables d'activer par eux-mêmes un courant sur les fibroblastes cardiaques avant que le pinacidil n'ait exercé son effet.



**Figure R2 : Tracés de courants enregistrés en configuration cellule entière lors de dépolarisations membranaires allant de -120 mV à 50 mV en condition contrôle, en présence de pinacidil et en présence de pinacidil 100  $\mu\text{M}$  + CP 500  $\mu\text{M}$ .**



**Figure R3 : Courbes I/V représentant les effets de 100  $\mu\text{M}$  de pinacidil et 500  $\mu\text{M}$  de CP sur les enregistrements en patch-clamp en configuration cellule-entière sur les fibroblastes ventriculaires de rat.**

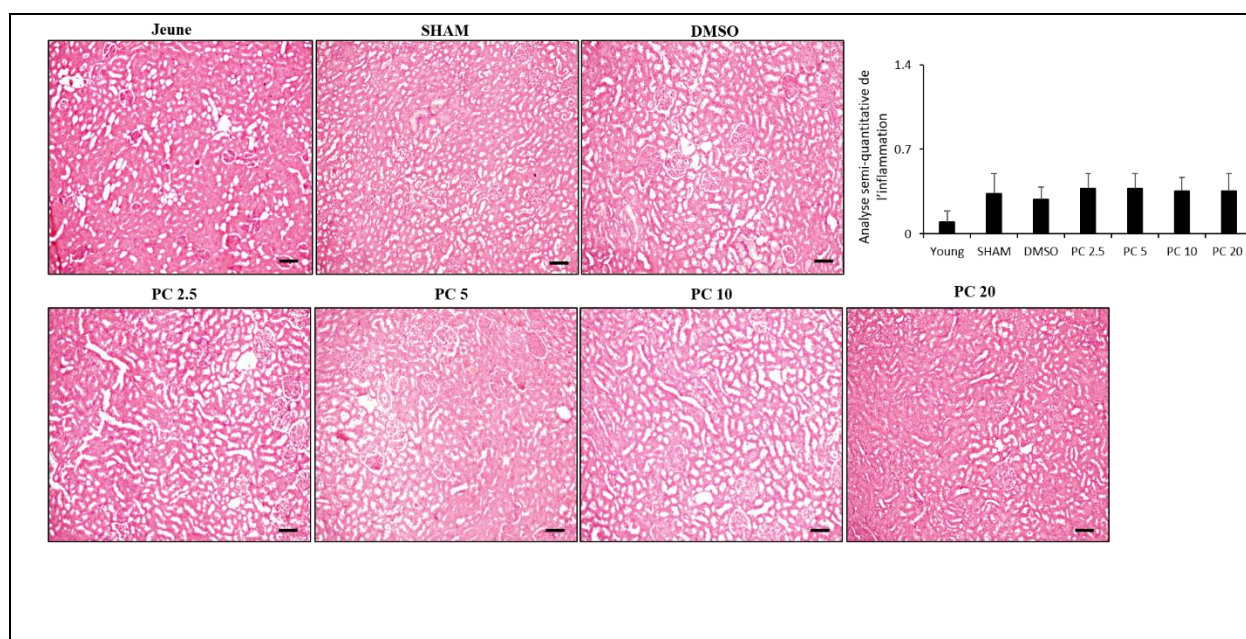
○ Contrôle, ● 100  $\mu\text{M}$  pinacidil, ■ 500  $\mu\text{M}$  poudre.

Ces résultats extrêmement préliminaires suggèrent que les CP activent, après son activation par le pinacidil, le courant potassique rectifiant sortant de type SUR2/Kir6.1 déjà décrit dans les fibroblastes ventriculaires de rat (Benamer *et al.*, 2009; Benamer *et al.*, 2011). En tout état de cause, même s'il nous est impossible de présenter de conclusion définitive sur la base de résultats aussi préliminaires, il semble que les CP n'exercent pas d'effet clair en aigu sur la physiologie des fibroblastes ventriculaires aux concentrations qui ont été testées. Toutefois, les conditions expérimentales que nous avons rencontrées dans nos cultures de fibroblastes ne nous ont pas permis de conduire ces expériences avec régularité et ne nous permettent pas actuellement de présenter des résultats globalisés.

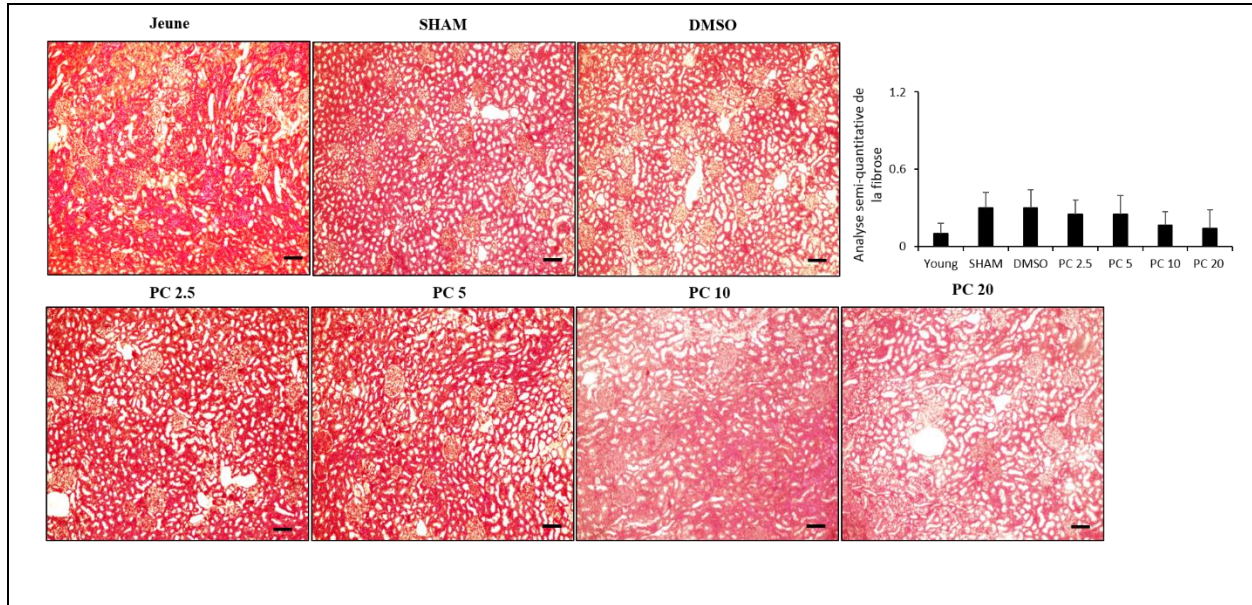
#### 4 Effet des CP administrés à long terme aux rats sur le vieillissement rénal

L'âge affecte également la fonction rénale. L'effet de la consommation, sur le long terme des CP, a été évalué sur la morphologie et la fonction rénales dans nos conditions expérimentales. Les résultats obtenus restent préliminaires mais encourageants. Les caractéristiques de la poudre riche en CP administrée aux rats figurent dans la partie III.1.

Les coupes histologiques effectuées sur des reins de rats issus des 6 groupes montrent l'absence d'infiltrats leucocytaires, de fibrose interstitielle, de sclérose ou de signes de congestion glomérulaires, et enfin l'absence d'atrophie tubulaire. Tous ces signes sont en faveur d'une architecture rénale comparable entre les groupe contrôles et les groupes PC, dans nos conditions expérimentales (**Figure R4 et R5**).

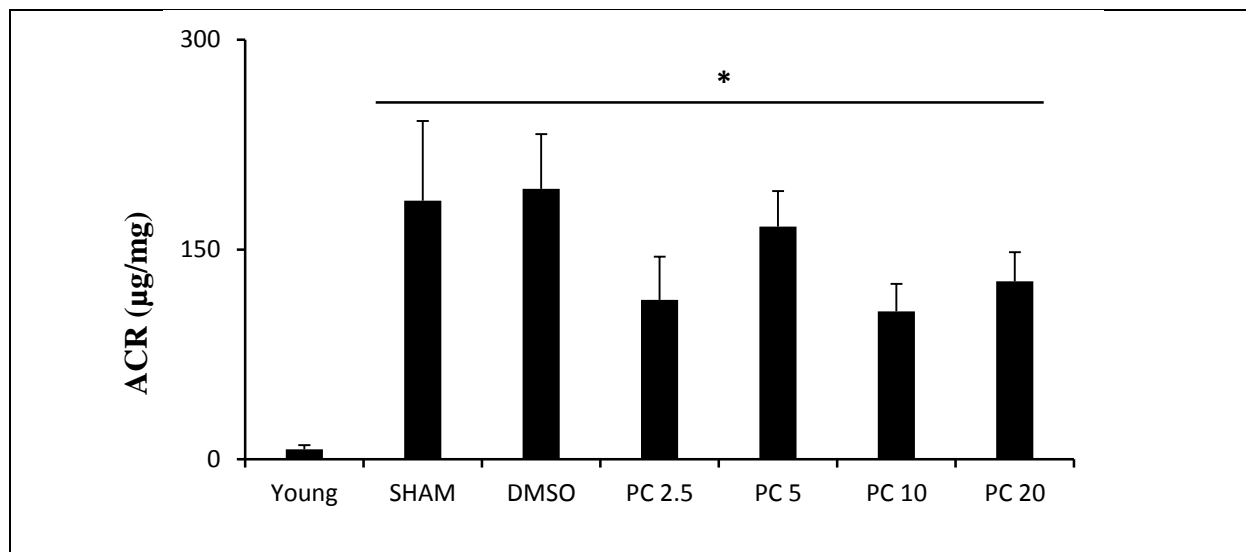


**Figure R4: Microphotographies des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine, représentatives du rein de rats des différents groupes : Jeune, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20 (Grossissement x 100. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m). n=6-8/groupe.**



**Figure R5 : Microphotographie des coupes histologiques colorées au trichrome de masson, représentatives du rein de rats des différents groupes : Jeune, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20 (Grossissement x 100. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m). n=6-8/groupe.**

De plus, tous les rats âgés de 17 mois, contrôles et traités, ont montré une augmentation significative du ratio albumine : créatinine albumine/créatinine (ACR) par rapport aux rats jeunes. En revanche, on observe une tendance (bien que non significative) chez les groupes de rats traités par les CP à empêcher le déclin de la fonction rénale.



**Figure R6 : Histogramme représentant le taux d'ACR chez les groupes de rats jeunes, SHAM, DMSO, PC 2.5, PC 5, PC 10 et PC 20. n= 6-8/groupe. \* p < 0.05 vs. Young.**

## 5 Effet de la consommation régulière des CP sur le microbiote intestinal

Le processus de vieillissement est associé à des altérations des fonctions physiologiques et peut également affecter la composition du microbiote. Ces changements incluent une réduction de la diversité des espèces, une moindre abondance des micro-organismes bénéfiques et une augmentation des bactéries pathogènes. Bien que la consommation des CP exerce un effet sur la communauté résidente de l'intestin, il n'y a pas de données dans la littérature qui révèlent l'effet de ces composés sur le microbiote avec l'âge.

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'effet d'une consommation régulière de CP extraits de marc de raisin pendant 14 mois sur le microbiote intestinal de rats Wistar. Les caractéristiques de la poudre riche en CP administrée aux rats figurent dans la partie III.1. Les échantillons fécaux des rats jeunes âgés de 3 mois et des rats traités et contrôles sont collectés à 6 et 14 mois après traitement. La composition du microbiote est analysée par qPCR.

Les résultats obtenus montrent que *Bifidobacterium* prédominait chez les groupes PC 2.5 et PC 5 comparés aux rats contrôles et jeunes. L'abondance relative de *Lactobacillus* a diminué avec le temps chez tous les rats traités ou contrôles. *Bacteroides*, *Clostridium leptum* subgroup (*Clostridium* cluster IV) et *Enterococcus* n'ont pas été significativement modifiés par aucune concentration de CP comparés au groupe contrôle. Néanmoins, après 14 mois de traitement, toutes les concentrations de CP semblent avoir empêché l'augmentation de *Clostridium sensu stricto* (cluster I) (*Clostridium* cluster I) observé chez le groupe contrôle par rapport aux rats jeunes.

En conclusion, un traitement à long terme par les CP module sélectivement le microbiote intestinal de rat vers un phénotype plus sain. Le mélange de CP réduit significativement l'abondance des bactéries pathogènes et potentialise la croissance des probiotiques. Par conséquent, les CP pourraient régesser les effets délétères du vieillissement sur la population bactérienne intestinale.

Les résultats ci-dessus ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « **Journal of Food Science** » en décembre 2017. Cet article s'intitule « **The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota** » (Chacar *et al.*, 2018).

# The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota

Stéphanie Chacar, Tarek Itani, Joelle Hajal, Youakim Saliba, Nicolas Louka, Jean-François Faivre, Richard Maroun, and Nassim Fares 

**Abstract:** The aim of this work is to evaluate the impact on the rat microbiota of long-term feeding with phenolic compounds (PC) rich grape pomace extracts. Thirty, 2-mo-old rats, were divided into 5 groups. Four groups were treated with different concentrations of PC (2.5, 5, 10, and 20 mg/kg/d diluted in 0.1% DMSO), and 1 group received 0.1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) alone (control group). The daily treatment lasted 14 mo. Major phenolic compounds constituents were characterized by the high-performance liquid chromatography and free radical scavenging capacity was measured by means of the DPPH assay. Fecal samples from young rats (2-mo old), and rats daily fed with PC or DMSO were collected at 6 and 14 mo posttreatment. The gut microbiota composition was analyzed by quantitative polymerase chain reaction. *Bifidobacterium* was significantly higher in the groups PC 2.5 and PC 5 than in control and young rats. *Lactobacillus* decreased with time in all treated and untreated groups. *Bacteroides*, *Clostridium leptum* subgroup (Clostridium cluster IV), and *Enterococcus* were not significantly changed by PC at any concentration when compared to control; nevertheless, after 14 mo of treatment all concentrations of PC abolished the increase of *Clostridium sensu stricto* (cluster I) (*Clostridium* Cluster I) observed in the control group when compared to young rats. PC do modulate selectively rat gut microbiome to a healthier phenotype in long-term feeding rats, and could counteract the adverse outcomes of aging on gut bacterial population.

**Keywords:** aging, gut microbiota, phenolic compounds

**Practical Application:** This research shows that phenolic-rich grape pomace extracts exhibiting a high antioxidant activity, selectively modulate rat gut microbiota to a healthier phenotype within age in a long-term feeding rats.

## Introduction

Gut microbiota (GM) has become lately the subject of widespread researches. Besides being a reflection tool of the intestinal health, the microbiome has a huge influence on the overall host physiology, brain development, metabolism, nutrition, and immune function (Zhu and others 2016). The relative stability of the GM is affected throughout adult life by many environmental factors such as lifestyle, diet, stress, bacterial infections, and exposure to antibiotics (Rodriguez and others 2015). The changes of the complex bacterial community can have major consequences either beneficial or harmful on the host health (Guinane and Cotter 2013). The increase of the relative abundance of pathogenic bacteria is related to various metabolic and inflammatory disorders such as obesity, diabetes (Baothman and others 2016), asthma (Fujimura and Lynch 2015), neurodegeneration (Sampson and others 2016), inflammatory bowel disease (Hammer 2011), and irritable bowel syndrome (Bhattarai and others 2017).

The bacterial species in the rat intestine are as rich as in the human GM. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* are detected. As well, the Clostridium superfamily is widely represented and is distributed among the *C. coccoides* group (Clostridium cluster XIVa) and the *C. leptum* subgroup (Clostridium cluster IV). In contrast to humans, *Lactobacillus* species represent a significant proportion of the rat microbiota and can reach 10% to 15% of the total sequences read (Tomas and others 2012).

GM is fundamental for food precursor biotransformation into their metabolites after ingestion (Tzounis and others 2008). For instance, microbial polyphenol metabolism depends on many factors among which we quote mainly the large inter-individual differences of the gut, the small differences in substitution pattern of specific phenolic compounds (PC), and the chemical composition of the PC-rich food matrix ingested. Consequently, metabolites with biological activities are produced (van Duynhoven and others 2011). Along with the intensive ongoing researches, the polyphenol-rich matrices were classified as nutraceutical food, because of their medicinal and health benefits (Varzakas and others 2016). Structurally, the PC, also known as active molecules, belong to various categories based on the chemical nature of their functional groups (Balasundram and others 2006). A high percentage of PC is not absorbed in the small intestine, therefore encountering the GM which colonizes the colon (Ozdal and others 2016). Thereby, PC modulate the composition of the GM by enforcing the decrement in count of pathogens and stimulating beneficial bacteria (Queipo-Ortuno and others 2012). Fruits, vegetables, cereals, and beverages such as wine, tea, cider, and

JFDS-2017-1419 Submitted 8/12/2017, Accepted 11/12/2017. Authors Chacar, Louka, and Maroun are with Centre d'Analyses et de Recherche, UR GPF Laboratoire SIM, Faculté des Sciences, Univ. Saint-Joseph, Beyrouth, Liban. Authors Chacar, Hajal, Saliba, and Fares are with Laboratoire de recherche en Physiologie et Physiopathologie, LRPP pôle technologie santé, Faculté de Médecine, Univ. Saint Joseph, Beyrouth, Liban. Authors Chacar and Faivre are with Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), ERL CNRS 7368, Univ. de Poitiers, France. Author Itani is with Laboratoire Rodolphe Mérieux, pôle technologie santé, Faculté de Pharmacie, Univ. Saint Joseph, Beyrouth, Liban. Direct inquiries to author Fares (E-mail: nassim.fares@usj.edu.lb).



## Long-term intake of phenolic compounds...

beer are part of the polyphenols-rich food diet (Pandey and Rizvi 2009).

Normal aging process is associated with alteration in physiological functions and can affect the composition of the GM (Kumar and others 2016). These reported age-related differences include a reduction in species diversity, shifts in the dominant species, decline in beneficial microorganisms, and increase in pathogenic bacteria (Salazar and others 2014). Although the intake of PC exerts significant effect on the gut resident community (Valdes and others 2015), the effect of dietary PC on the GM within age remains poorly defined. The aim of this work is to evaluate the impact on the rat microbiota of long-term feeding with PC-rich grape pomace extracts.

## Materials and Methods

### Reagents and chemicals

All reagents were of analytical grade. Sodium carbonate (Fluka, Buchs, Switzerland), Folin's phenol reagent (SCOTT SCIENCE U.K., Woodlands Close), and gallic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) were utilized in the Folin-Ciocalteu assay. 2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical and ( $\pm$ )-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma Chemical Co. The high-performance liquid chromatographic (HPLC) solvents were methanol (Merck, Darmstadt, Germany), formic acid (Scharlau, Barcelona, Spain), and water (Scharlau) of HPLC ultra gradient grade. PC standards of gallic acid, protocatechuic acid, ferulic acid, trans-cinnamic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and resveratrol were from Sigma Chemical Co.

### Preparation of phenolic compounds mixture

The grape pomace byproducts used in this work are the solid remains of grapes obtained in wine industries after the pressing step. It contains the skins, pulp, seeds, and stems of the fruit.

In our study, we used 3 different grape types: Cabernet Sauvignon, Marselan, and Syrah. The corresponding byproducts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Once defrosted at room temperature, the grape byproducts were milled in order to obtain a homogeneous mixture. A heat solid/liquid extraction process of the PC with 70% ethanol/water was performed at a ratio of 1:2 (w/v) with agitation, following the experimental procedure developed in our laboratory by Rajha and others 2014. Then the solutions were spray dried in order to obtain a powder consisting of a pure mixture of PC.

### Animals and diets

This study was approved by the ethical committee of Saint Joseph Univ. of Beirut. The protocols were designed according to the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the Council of the American Physiological Society and were in adherence to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. Natl. Inst. of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and according to the European Parliament Directive 2010/63 EU. Thirty male adult Wistar rats were used. The animals were kept at a stable temperature ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $50\% \pm 5\%$ ) and were exposed to 12:12 h light-dark cycle. They were fed ordinary with rodent chow and were acclimatized at least 1 wk under these conditions before the start of the study. The treatment was conducted for 14 mo. The rats were divided into 5 groups randomly ( $n = 6$  per group), which were given, in the drinking water, different concentrations of PC: 2.5, 5, 10, and

20 mg/kg/d (for PC 2.5, PC 5, PC 10, and PC 20, respectively) or 0.1% DMSO vehicle (control group). The concentration of PC were calculated and administered to the rats following the quantification of these compounds found in the powder as obtained by Folin-Ciocalteu method in order to obtain the exact final amount 2.5, 5, 10, and 20 mg/kg/d.

### Quantification of total PC

Total PC contained in the powder were quantified using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay against a standard curve of gallic acid and expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g of the final powder (Singleton and others 1999).

### Free radical scavenging capacity

The free radical scavenging capacity (AC) of the powder was measured by means of the DPPH assay (Brand-Williams and others 1995). As previously described, 50  $\mu\text{L}$  of vine shoot extracts or standard (Trolox) were added to 1.45 mL of DPPH radical (0.06 mM). After an incubation of 30 min at room temperature, the absorbance was measured at 515 nm. The DPPH value of the extracts was expressed in micromolar Trolox equivalent per milliliter ( $\mu\text{MTE}$ ; Rajha and others 2015).

### High-performance liquid chromatographic

The HPLC analyses were conducted for the identification and quantification of PC from grape pomace extracts. The HPLC-DAD analyses were carried out with an HPLC system (Waters Alliance, Milford, MA, U.S.A.) equipped with a quaternary Waters e2695 pump. The method was adapted based on the review by Khoddami and others (2013). In addition to a UV-vis photodiode array spectrophotometer (250 to 700 nm) Waters 2998, a fluorescence detector (excitation 330/emission 374 nm) was used with the control system and data collection Empower 3 software. The PC separation was realized on a Discovery C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm, column (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, U.S.A.) with a C18, Supelguard Discovery 18, 20  $\times$  4 mm, 5  $\mu\text{m}$  precolumn (Supelco) at 30  $^{\circ}\text{C}$ . Separation of 100  $\mu\text{L}$  of grape pomace extract was performed at a flow rate of 1 mL/min. Mobile phase A consisting of 5% (v/v) formic acid in water and mobile phase B consisting of 100% methanol were used. The elution profile had the following proportions (v/v) of solvent B: 5 min, 8%; 50 min, 27%; 75 min, 50%; 85 min, 100% and kept at 5% of B during 25 min.

### Fecal samples collection and DNA extraction

Fecal samples were collected at baseline from young untreated rats (2 mo old), and from rats daily fed with PC or vehicle at 6 and 14 mo posttreatment. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Total DNA was extracted from 150 mg of fecal sample using the "ISOLATE Fecal DNA Kit" (Bioline; Alexandria, NSW, Australia) that by combining the stringency of guanidium-thiocyanate lysis, high-density bashing beads, and the speed and ease-of-use of silica-membrane purification allows to remove humic acids/polyphenols. The concentration of DNA was measured using a Nanodrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific, Bartlesville, OK, U.S.A.). Quantitative analysis of intestinal microbiota of the different bacterial genera was carried out by quantitative PCR (qPCR). The selected groups of bacteria are: *Bacteroides/Prevotella* group, *Bifidobacterium* genus, *Enterococcus* genus, *Lactobacillus/Leuconostoc* group, *Clostridium leptum* subgroup, and *Clostridium sensu stricto* (cluster I) (*Clostridium* Cluster I) (which includes *C. perfringens* and *C. butyricum*). The targeted bacteria,

Long-term intake of phenolic compounds...

**Table 1—Oligonucleotides used for qPCR analysis.**

Target bacteria	Annealing (°C)	Sequence (5'-3')	Reference
All bacteria	55	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT GGA CTA CCA GGG TAT CTA A	Amann and others (1990) Magne and others (2006)
<i>Bacteroides/Prevotella</i> group	59	GAA GGT CCC CCA CAT TG GCA CTT AAG CCG ACA CGT	Manz and others (1996) Doré and others (1998)
<i>Bifidobacterium</i>	62	GGG TGG TAA TGC CGG ATG CCA CCG TTA CAC CGG GAA	Kok and others (1996)
<i>Enterococcus</i>	60	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT	Rintilla and others (2004)
<i>Lactobacillus/Leuconostoc</i> group	64	CGC CAC TGG TGT TCC ATA TA AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	Furet and others (2009)
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	55	GCA CAA GCA GTG GAG T CTT CCT CCG TTT TGT CAA	Matsuki and others (2004)
<i>Clostridium</i> (cluster I)	58	TAC CHR AGG AGG AGG CCA C G TTC TTC CTA ATC TCT ACG CAT	Song and others (2004)

annealing temperatures, primer sequences, and literature references are given in Table 1. All reactions were performed using Hard-Shell<sup>®</sup> Low profiles 96-plates sealed with Microseal<sup>®</sup> B adhesive seals (Bio-Rad, Hercules, Calif., U.S.A.) and SsoAdvanced Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad) in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The total bacterial copy number was determined using universal 16S rRNA universal primers. The reaction mixture contained 2 µL template fecal DNA (diluted 1:10 to 1:100 in pure water), 0.16 to 0.32 µM of each primer, and 2X SYBR<sup>®</sup> Green supermix in a reaction volume of 25 µL PCR.

Thermal cycling consisted of an initial cycle of 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 1 min at the appropriate primer-pair Tm and 2 min at 68 °C. The fluorescent product was detected at the last step of each cycle. Standard curves were obtained from serial dilutions of a known concentration of plasmid DNA containing a 16S rRNA gene insert from each species or group. The plasmid concentration was determined by spectrophotometry and the quantity of target gene in a sample was determined using these standard curves. The bacterial concentration in each sample was calculated by comparing the Ct values obtained from standard curves. Results were converted to log<sub>10</sub> CFU/g of feces after taking into account the number of 16S rRNA operons (Ribosome Database Project, Michigan State Univ., East Lansing, Mich., U.S.A.) in each genus or family. The detection limit depended on the bacterial groups and ranged between 10<sup>4</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/g.

**Statistical analysis**

Differences in the relative abundance of fecal microbiota were analyzed using SigmaPlot Software (version 12.5). Statistical analysis was performed with 1-way ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls test. Significance was set below 0.05 for all analysis.

**Results and Discussion**

**Major constituents of grape pomace extract and free radical scavenging capacity**

The results of Folin–Ciocalteu analysis showed that the final powder contains 920 mg/g of phenolic compounds (92% of the total mass of the powder). The left 8% are residual sugars and other not determined compounds coextracted with PCs. High free radical scavenging capacity of grape pomace extract consists of 6028 µMTE equivalent to 92% of inhibition of free radicals.

**Table 2—Phenolic compounds found in the grape pomace extract used in this study.**

Phenolic compound	mg/g of powder
Malvidin	42
Delphinidin	27.8
Rutin hydrate	5.8
Quercetin	3.4
Catechin	0.8
Coumaric acid	0.75
Kaempferol	0.39
Trans-cinnamic acid	0.17

In our study, in order to identify and quantitate the PC present in the powder, we used 17 PC standards commonly cited in the literature, among them 8 compounds were detected by HPLC (Table 2), providing insight into the potential influence of the powder on the gut microbial modulation. Several other PCs, present as well in the powder, were not characterized due to missing standards in our laboratory. At all events, regardless of the PC identified, we think that the observed effect might be due to the secondary metabolites produced in the plasma and that can act in synergy independently of the initial precursors. Until present, the synergistic effect of PC and of the secondary metabolites remains poorly defined. Several studies investigating the mechanisms of action and the bioactive molecules produced after consumption of PC stated that the final outcome of a mixture of PC differ from the impact of an individual compound without defining the exact mechanism of the synergistic effect that occurred (Zhang and others 2011; Feliciano and others 2016).

**Quantitative analysis of intestinal microbiota by qPCR**

The analyses of selected bacterial colonization using qPCR in young, control and treated rats with PC after 6 and 14 mo post-treatment are summarized in Figure 1. The mean of log<sub>10</sub> (CFU/g) of all bacteria genomes copies are given in Table 3. All bacteria data showed no difference in the overall quantity of the species within time.

The abundance of *Bifidobacterium* was found to be significantly different (*P* < 0.05) in PC 2.5 and PC 5 groups at 6 and 14 mo posttreatment when compared to control and young. Despite the stability of this specie within age, the treatment with low doses of PC has been able to increase significantly by 27% and 21%, respectively (6 and 14 mo posttreatment) its levels though the effect was lost at higher concentrations. A protective effect of a very low dose of dietary resveratrol (1 mg/kg/d for 25 d) was observed

Health, Nutrition, & Food

Long-term intake of phenolic compounds . . .

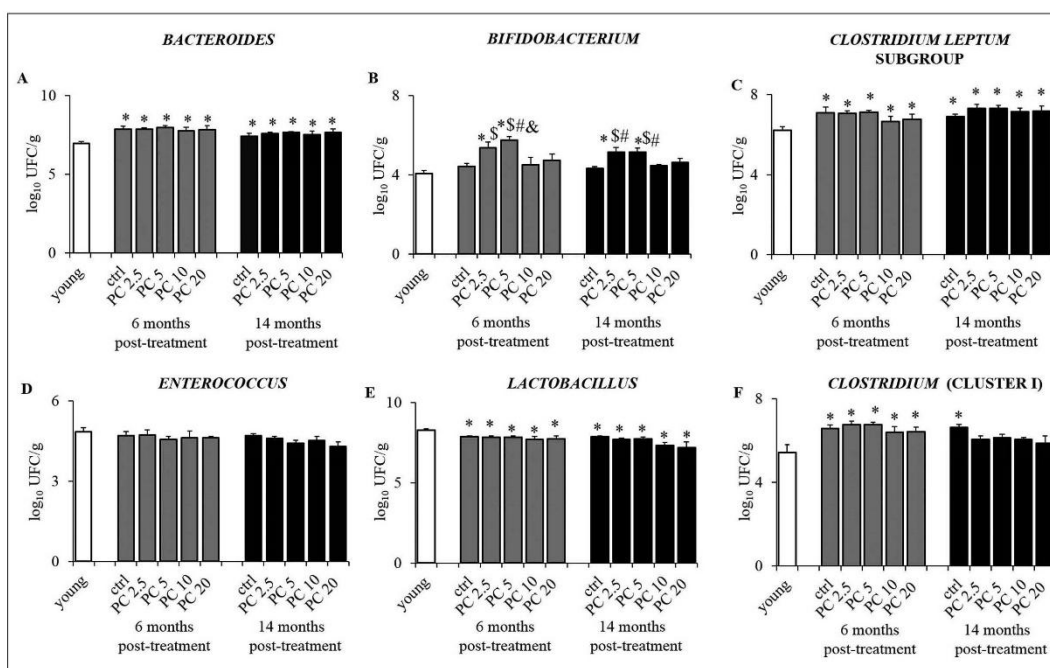


Figure 1—Selected bacterial strains density in stool ( $\log_{10}$  CFU/g) over 6 and 14 mo of treatment with phenolic compounds (PC) compared to young and control. (A) Bacteroides, (B) Bifidobacterium, (C) Clostridium leptum subgroup, (D) Enterococcus, (E) Lactobacillus, (F) Clostridium (cluster I). Each data column represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). \*,  $P < 0.05$  vs. young untreated rats; \$,  $P < 0.05$  vs. ctrl; #,  $P < 0.05$  vs. PC 10; &,  $P < 0.05$  vs. PC 20.

Table 3—The mean of  $\log_{10}$  (CFU/g) of all bacteria genome copies.

		$\log_{10}$ (CFU/g)					
		Young	Ctrl	PC 2.5	PC 5	PC 10	PC 20
All bacteria	6 m	13.36 $\pm$ 0.05	13.66 $\pm$ 0.27	13.86 $\pm$ 0.13	14.08 $\pm$ 0.06	13.74 $\pm$ 0.06	13.66 $\pm$ 0.08
	14 m	13.36 $\pm$ 0.05	13.7 $\pm$ 0.04	13.9 $\pm$ 0.13	13.9 $\pm$ 0.09	13.7 $\pm$ 0.07	13.73 $\pm$ 0.25

as well in a rat model of dextran sulfate sodium-induced colitis (Larrosa and others 2009). Changes occurring in the microbiota with age can have either a positive or negative impact on host health status (van Tongeren and others 2005). Usually, the age-related changes in the GM composition include a reduction in bifidobacterial counts associated with a decrease in adhesion to the intestinal mucosa (Arbolea and others 2016). No decrease was observed in our work between control and young groups as shown in other studies. This could be related to the fact that the rats have been living a normal aging without encountering pronounced diseases responsible of *Bifidobacterium* reduction such as inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, allergies, or obesity (Vaiserman and others 2017). In the treated groups with PC 2.5 and PC 5, we found a higher abundance of *Bifidobacterium* regarded as one of the most beneficial bacteria. The nonadditional effect observed at high concentration could be related to a mechanism of saturation. Indeed, a dose-response of green tea rich in catechin was observed in healthy subjects at low- and medium-dose levels; however, catechin derivatives at high doses had no significant effect. This interesting result was related to the saturation of catechin derivatives in plasma (Renouf and others 2013).

According to our HPLC results, catechin has been identified and quantified among many other PCs in the powder. The saturation of its derivatives in the plasma might have been responsible of the absence of a dose response at high doses (PC 10 and PC 20). The consumption of a matrix rich in PC appears to be in some cases dose dependent and specific to each metabolite produced in the plasma (Lorenzo and Munekeat).

The intake of PC significantly decreased the abundance of *Lactobacillus* vs. young by 6% similarly as observed for the control. *Lactobacillus* constitute an integral part of healthy gastrointestinal (GI) micro-ecology. They control the growth of undesirable organisms in the intestinal tract (IT) by production of antibacterial substances such as organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins and have an immuno-regulatory role (Denev 2006). A decrease in lactobacillus with age have already been reported by Woodmansey and it could along with either a general reduction in species diversity or changes to digestive physiology (Woodmansey 2007). The reduction observed with aging in PC groups may be arisen from the bioconversion of PC by the GM, as bioactivities of PC depend on the nature and concentrations of metabolites reaching the target tissues (Noratto and others 2014). Several *in vitro* and

*in vivo* studies revealed either increase or reduction of growth of *Lactobacillus* depending on the precursor or the metabolite used. The relative abundance of *Lactobacillus* increased with gallic acid, punicalagin, proanthocyanidins, and resveratrol. On the other hand, (+)-catechin, (–)-epicatechin, and quercetin had no significant effect (Ozidal and others 2016; Ozidal 2016). Catechin, coumaric acid, delphinidin, rutin hydrate, malvidin, trans-cinnamic acid, quercetin, and kaempferol were identified in our mixture. Remarkably, all together, some compounds' biological activity could be masked by others, making it difficult to understand the exact synergistic effect that may occur. In addition, a dose of 250 mg/kg/d of pomegranate extract or 15 mg/kg/d of its main microbiota derived metabolite, urolithin A for 25 d showed an increase in lactobacillus levels compared to the control group (Larrosa and others 2010; Ozidal and others 2016). Thus *Lactobacillus* may require higher doses of PC than those used in our study to maintain an adequate environment for their growth.

The relative abundance of *Clostridium* (cluster I) increased in control and PC groups 6 mo posttreatment by an average of 17%. Interestingly, 14 mo of treatment with 4 different concentrations of PC inhibited the increase observed previously of this pathogen bacteria, whereas its levels in the control group remained significantly higher than young rats. Despite being a normal constituent of the intestinal flora, when *Clostridium* (cluster I) are overpopulated for a long-term, they become responsible for serious infections (Lakshminarayanan and others 2013). The long-term treatment with PC did modulate the rat gut microbiome to a healthier phenotype by inhibiting the increase of this pathogen bacteria.

In our study, neither age-related changes were observed for *Enterococcus*, nor did PC modulate the stability of this species. *Enterococcus* are known as commensal bacteria, but can act as well as opportunistic pathogens (Lebreton and others 2014). No positive associations between age and the diversity and dynamics of enterococcal populations in the fecal microbiota were established (Tedim and others 2015). *Bacteroides* and *Clostridium Leptum* subgroup relative abundance significantly increased with age (9% and 11% respectively) similarly in control and PC groups. *Bacteroides* and *Clostridium Leptum* subgroup are important members of the gut flora by promoting healthy aging (Lopetuso and others 2013). Whereas their levels significantly increased in control within age (Zhang and others 2013), PC had no effect at any concentrations.

### Conclusion

In conclusion, we provide evidence that a long-term treatment with a mixture of PC do modulate selectively rat gut microbiome to a healthier phenotype. We found that the mixture of PC can inhibit non beneficial bacteria from the rat microbiota and potentiate the growth of probiotic ones. PC did inhibit the growth of *Clostridium* (cluster I) after 14 mo of treatment with 4 different concentrations, and enhanced as well the growth of probiotic bacteria such as *Bifidobacterium* from 6 mo of treatment. Therefore, PC could counteract the adverse outcomes of aging on gut bacterial population. As perspective, the influence of PC on GM should be analyzed as well by using metagenomic approach (16S rRNA gene sequencing). Furthermore, it would be interesting to study the effects of these compounds on pathologies associated to aging as hypertension, diabetes, neurodegenerative diseases.

### Acknowledgments

This work was supported by the Research Council of Saint Joseph Univ. of Beirut, Projects FS93 and FM281. No conflicts of interest.

### Authors' Contributions

SC, RM, and NF designed the research, performed experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. TI performed experiments and helped for data analysis. NL performed experiments. JH and YS helped for data acquisition. JFF helped for draft the manuscript. All authors contributed to manuscript writing and edition.

### Conflict of Interest

The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### References

Arbolea S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. 2016. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front Microbiol* 7:1–9.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99:191–203.

Boothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. 2016. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis* 15:1–8.

Bhattarai Y, Muniz Pedrego DA, Kashyap PC. 2017. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *American journal of physiology. Gastrointest Liver Physiol* 312(1):G52–62.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28(1):25–30.

Denev SA. 2006. Role of lactobacilli in gastrointestinal ecosystem. *Bulgarian J Agric Sci* 12:63–114.

Feliciano RP, Istaş G, Heiss C, Rodriguez-Mateos A. 2016. Plasma and urinary phenolic profiles after acute and repetitive intake of wild blueberry. *Molecules* 21(9):1–15.

Fujimura KE, Lynch SV. 2015. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe* 17(5):592–602.

Guinane CM, Cotter PD. 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol* 6(4):295–308.

Hammer HF. 2011. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Digest Dis* 29(6):550–3.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18(2):2328–75.

Kumar M, Babaei P, Ji B, Nielsen J. 2016. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. *Nutr Health Aging* 4(1):3–16.

Lakshminarayanan B, Harris HM, Coakley M, O'Sullivan O, Stanton C, Pruteanu M, Shanahan F, O'Toole PW, Ross RP, consortium E. 2013. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from the faecal microbiota of elderly Irish subjects. *J Med Microbiol* 62(Pt 3):457–66.

Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Yanez-Gascon MJ, Selma MV, Azorin-Ortuno M, Toti S, Tomas-Barberan F, Dolara P, Espin JC. 2010. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem* 21(8):717–25.

Larrosa M, Yanez-Gascon MJ, Selma MV, Gonzalez-Sarrias A, Toti S, Ceron JJ, Tomas-Barberan F, Dolara P, Espin JC. 2009. Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation, and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J Agric Food Chem* 57(6):2211–20.

Lebreton F, Willems RJJ, Gilmore MS. 2014. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston.

Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V, Gasbarrini A. 2013. Commensal clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog* 5(1):1–8.

Lorenzo JM, Munekat PES. 2016. Phenolic compounds of green tea: health benefits and technological application in food. *Asian Pacific J Trop Biomed* 6(8):709–19.

Noratto GD, Garcia-Mazcorro JF, Markel M, Martino HS, Minamoto Y, Steiner JM, Byrne D, Suchodolski JS, Mertens-Talcott SU. 2014. Carbohydrate-free peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus salicina*) [corrected] juice affects fecal microbial ecology in an obese animal model. *PLoS One* 9(7):e101723.

Ozidal T, Sela DA, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 8(2):1–36.

Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med Cell Longev* 2(5):270–8.

Queipo-Ortuno MJ, Boto-Ordóñez M, Murri M, Gomez-Zumaquero JM, Clemente-Postigo M, Estruch R, Cardona Diaz F, Andres-Lacueva C, Tinahones FJ. 2012. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr* 95(6):1323–34.

Rajha HN, Ziegler W, Louka N, Houbaiqa Z, Vorobiev E, Boechzelt HG, Maroun RG. 2014. Effect of the drying process on the intensification of phenolic compound recovery from grape pomace using accelerated solvent extraction. *Int J Mol Sci* 15(10):18640–58.

Rajha HN, Chacar S, Afif C, Vorobiev E, Louka N, Maroun RG. 2015. beta-Cyclodextrin-assisted extraction of polyphenols from vine shoot cultivars. *J Agric Food Chem* 63(13):3387–93.

Renouf M, Marmet C, Guy PA, Beaumont M, Lepage M, Williamson G, Dionisi F. 2013. Dose-response plasma appearance of green tea catechins in adults. *Mol Nutr Food Res* 57(5):833–9.

Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OJ, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmaln MC, Marchesi JR, Collado MC. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbiol Ecol Health Dis* 26:1–17.

Salazar N, Arbolea S, Valdes L, Stanton C, Ross P, Ruiz L, Gueimonde M, Reyes-Gavilan C. 2014. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet* 5:1–9.

Health, Nutrition, & Food

Long-term intake of phenolic compounds . . .

Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schreier CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Witting Stalhede P, Knight R, Mazmanian SK. 2016. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* 167(6):1469–80 e12.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299:152–78.

Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodriguez CM, Canton R, Willems RJ, Baquero F, Coque TM. 2015. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol* 81(5):1820–31.

Tomas J, Langella P, Cherbuy C. 2012. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. *Anim Health Res Rev* 13(1):54–63.

Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. 2008. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br J Nutr* 99(4):782–92.

Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. 2017. Gut microbiota: a player in aging and a target for anti-aging interventions. *Ageing Res Rev* 35:36–45.

Valdes L, Cervero A, Salazar N, Raus-Madiedo P, Guemonde M, Gonzalez S. 2015. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct* 6(8):2424–39.

van Duynhoven J, Vaughan EE, Jacobs DM, Kemperman RA, van Velzen EJ, Gross G, Reger LC, Possemiers S, Smilde AK, Dore J, Westerhuis JA, Van de Wiele T. 2011. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(Suppl 1):4531–8.

van Tangeren SP, Slaets JP, Harmsen HJ, Welling GW. 2005. Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71(10):6438–42.

Vazakas I, Zakynthinos G, Verpoort F. 2016. Plant food residues as a source of nutraceuticals and functional foods. *Foods* 5(4):1–32.

Woodmansey EJ. 2007. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102(5):1178–86.

Zhang A, Sun H, Yuan Y, Sun W, Jiao G, Wang X. 2011. An in vivo analysis of the therapeutic and synergistic properties of Chinese medicinal formula Yin-Chen-Hao-Tang based on its active constituents. *Fitoterapia* 82(8):1160–8.

Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, Zhao G, Zhang M, Pang X, Yan Z, Liu Y, Zhao L. 2013. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nat Commun* 4:1–10.

Zhu Y, Li H, Xu X, Li C, Zhou G. 2016. The gut microbiota in young and middle-aged rats showed different responses to chicken protein in their diet. *BMC microbiology* 16(1):1–9.

## 6 Bioactivité des métabolites urinaires des composés phénoliques extraits de marc de raisin

La grande diversité des CP présents dans les matrices alimentaires complique l'analyse de leur biodisponibilité et leur effet sur la santé et le métabolisme fonctionnel. Dans la partie précédente, nous avons montré que les CP modulent sélectivement la composition du microbiote au cours du vieillissement, mais on connaît très peu sur le lien entre le devenir métabolique des composés ingérés et leur bioactivité, principalement en considérant les métabolites secondaires produits.

Dans cette partie de notre étude, nous avons évalué le devenir métabolique des CP administrés quotidiennement aux rats pendant 14 mois, afin d'identifier les métabolites qui pourraient être responsables des effets des CP observés sur le microbiote intestinal dans la partie III.5.

L'analyse urinaire des métabolites issus de la dégradation des CP est réalisée à l'aide d'une méthode LC-QTOF. 16 métabolites ont été identifiés dans l'urine des rats traités par la poudre issue du marc de raisin riche en CP. Leur détection est basée sur une large base de données comprenant tous les métabolites de CP trouvés dans la littérature sous forme native ou conjuguée. Pour une caractérisation optimale, les métabolites trouvés dans les urines de rats jeunes et contrôles ont été soustraits et ainsi éliminés de l'analyse. Parmi les 16 métabolites détectés, un total de 7 métabolites [M-H]<sup>-</sup>, 7 sulfatés, 1 méthylé et 1 glucuronide ont été identifiés.

Certains métabolites ont été détectés dans l'urine tout au long du traitement comme l'acide homovanillique, l'acide férulique et l'acide benzoïque, alors qu'on a observé des fluctuations pour d'autres tels que l'acide coumarique, la génistéine et le valérolactone. L'acide 3-hydroxyphenylacétique et 2-(4-hydroxyphenyl) propionique ont été détectés simultanément et donc corrélés avec la croissance de *Bifidobacterium* dans le microbiote des rats PC 2.5 et PC 5. De plus, la présence du métabolite sulfaté, le daidzedin détecté dans l'urine de tous les rats traités après 14 mois de traitement, pourrait être responsable de l'inhibition de la croissance de *Clostridium* (Cluster I) observée après la même période de traitement (Chacar *et al.*, 2018).

Ces résultats suggèrent que l'effet observé par les CP sur le microbiote intestinal semble être dû à des métabolites spécifiques produits après ingestion des composés précurseurs et/ou pourrait être dû à leur effet synergique.

Les résultats ci-dessus ont fait l'objet d'un article accepté et prochainement publié dans le journal « **Antioxydants** » en Mai 2018. Cet article s'intitule « **Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation** ».

Communication

# Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Extracts Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation

<sup>1,2,3</sup>Stéphanie Chacar, <sup>4</sup>Mehrad Tarighi, <sup>2</sup>Nassim Fares, <sup>3</sup>Jean-François Faivre, <sup>1</sup>Nicolas Louka, <sup>1\*</sup>Richard G. Maroun

<sup>1</sup> Centre d'Analyses et de Recherche, UR GPF, Laboratoire CTA, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

<sup>2</sup> Laboratoire de recherche en Physiologie et Physiopathologie, LRPP, pôle technologie santé, Faculté de Médecine, Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban.

<sup>3</sup> Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), Université de Poitiers EA 7349, Poitiers, France.

<sup>4</sup> Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC2MP), Université de Poitiers UMR CNRS 7285, Poitiers, France.

**Corresponding author** : \*Richard G. Maroun, Laboratoire Caractérisation et Transformation des Agro-ressources, URTVA, Faculté des Sciences, Université Saint Joseph de Beyrouth, Liban. Rue de Damas, BP 17-5208 - Mar Mikhaël Beyrouth - 1104 2020. Tel : 00961-1-421366; Fax : 00961-4-532657; Email : Richard.maroun@usj.edu.lb

**Email addresses**: Stéphanie Chacar ([stephanie.chacar@net.usj.edu.lb](mailto:stephanie.chacar@net.usj.edu.lb)); Mehrad Tarighi ([mehrad.tarighi@univ-poitiers.fr](mailto:mehrad.tarighi@univ-poitiers.fr)); Nassim Fares ([nassim.fares@usj.edu.lb](mailto:nassim.fares@usj.edu.lb)); Jean-François Faivre ([jean-francois.faivre@univ-poitiers.fr](mailto:jean-francois.faivre@univ-poitiers.fr)); Nicolas Louka ([nicolas.louka@usj.edu.lb](mailto:nicolas.louka@usj.edu.lb))

**Abstract:** The high diversity of phenolic compounds (PC) found in food matrices makes it challenging to analyze their bioavailability and their impact on health and functional metabolism. It is well recognized that PC do modulate the composition of the gut microbiota (GM), however literature still lacks significant data concerning the link between the metabolic fate of the ingested compounds and their bioactivity, mainly when considering the secondary metabolites produced. In this study, we assessed the metabolic fate of PC for a period covering 14 months of daily intake, in order to identify the metabolites that could be responsible for the occurred effects of PC on the GM observed in our previous work. Urinary analysis of polyphenol metabolites was performed using an LC-QTOF method. Among sixteen metabolites identified, 3-hydroxyphenylacetic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid were detected simultaneously and therefore correlated with the growth of *Bifidobacterium* in the rat GM. In addition, Daidzedin, detected only at 14 months post-treatment mostly interferes with the growth inhibition of *Clostridium* (Cluster I). In conclusion, the impact of long-term intake of PC on rat GM seems to be related to specific metabolites produced after ingestion of the parental compounds and/or might be due to their additional synergistic effect.

**Keywords:** Gut microbiota; antioxidants; phenolic compounds; urinary metabolites; aging.

---



## Introduction

It is common to hear nowadays about the importance of the daily consumption of phenolic compounds (PC) from food matrices and the obvious medicinal and health benefits they exert. Several studies targeted the metabolism of these compounds in order to know the proportion that will actually act in the body compared to the absorbed amount [(Feliciano *et al.*, 2016)]. Following the ingestion of PC, 5-10 % are absorbed by the small intestine and the remaining amount reaches the colon where it will undergo a hydrolysis process by the gut microbiota (GM) [(Gasperotti *et al.*, 2015)]. Then the produced aglycones are metabolized and undergo conjugation processes such as sulfation, methylation and glucuronidation [(Pimpao *et al.*, 2013)]. It is now admitted that the biotransformation of PC into their metabolites by GM increases their bioavailability, however they barely reach micromolar concentrations in plasma and urine [(Espin *et al.*, 2017)]. In addition, other studies pointed on the modulation of the composition of the gut microbial community by PC which takes part into the two-mutual reaction between PC and GM. In a previous work, we analyzed the rat gut microbiota composition following a long-term intake of PC rich grape pomace extracts. We found that *Bifidobacterium* growth was significantly higher than in control. *Lactobacillus* decreased with time in all treated and untreated groups. *Bacteroides*, *Clostridium leptum* subgroup (*Clostridium* cluster IV), and *Enterococcus* were not significantly changed by PC intake when compared to control. Nevertheless, after 14 months of treatment PC abolished the increase of *Clostridium* Cluster I observed in the control group. Thus, we clearly demonstrated that PC do modulate selectively rat gut microbiome to a healthier phenotype in long-term feeding rats. In fact, our results showed that long-term PC intake inhibited the growth of non-beneficial bacteria such as *Clostridium* (cluster I) and enhanced the growth of probiotic ones such as *Bifidobacterium* strain [(Chacar *et al.*, 2018)]. In this study, we were interested in identifying the metabolites produced following the consumption of the mixture of grape pomace for 14 months regardless of their quantification, then establishing a link between the metabolic fate of these compounds and their bioactivity on the GM studied in our previous work.

## Short methods

PC extraction was performed as previously described (Chacar *et al.*, 2018). Briefly, the PC were extracted from grape pomace extracts via a solid liquid extraction then the solutions were spray dried and a powder was obtained consisting of a pure mixture of PC.

Thirty male adult rats were used and the protocols were designed according to the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the Council of the American Physiological Society and were in adherence to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. Natl. Inst. of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and according to the European Parliament Directive 2010/63 EU. The study was approved by the ethical committee of Saint Joseph University of Beirut. The rats were divided into 5 groups randomly ( $n = 6$  per group), which were given, daily over 14 months in the drinking water, different concentrations of PC: 2.5, 5, 10, and 20 mg/kg/d (for PC 2.5, PC 5, PC 10, and PC 20, respectively) or 0.1% DMSO vehicle (control group). Quantification of total PC prior to their administration was realized as described in Chacar *et al.*, 2018.

### Urine analysis by LC-QTOF Mass Spectrometry

Urine samples were collected at baseline from young untreated rats (2 months old), and from rats daily fed with PC or vehicle at 6 and 14 months posttreatment. The collected urine samples were diluted with milli-Q water 1:10 and then filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter.

The characterization of the samples was performed with an Ultra-performance liquid chromatography with a QTOF mass spectrometer (UPLC/MS) (Bruker Maxis Impact HD), equipped with an electrospray source operating in negative ion and set to scan the metabolites in a range of  $m/z$  from 50 to 1000. The urinary metabolites separation was realized on an Acquity UPLC C18 column,  $1.7\ \mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 100\ \text{mm}$  (Waters, Ireland) with an Acquity UPLC C18 VanGuard pre-column,  $2.1 \times 5\ \text{mm}$ ,  $1.7\ \mu\text{m}$  (Waters, Ireland). The source temperature was set at  $200\ ^\circ\text{C}$  with a cone gas flow of  $500\ \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; a desolvation gas temperature of  $300\ ^\circ\text{C}$  and a nebulization gas flow of  $400\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ . The injection volume was  $10\ \mu\text{L}$ . Mobile phase A consisting of 0.1% formic acid in Ultra-pure water, mobile phase B consisting of 0.1% formic acid in methanol were used. The elution profile had the following proportions (v/v) of solvent: 95-5% of solvent A to 5-95% of solvent B during 10 min. The QTOF was calibrated with Na formate and acetate. Accurate mass measurements (error  $< 5\ \text{ppm}$  for analytes) were obtained by means of an automated calibrant delivery system using a dual-nebulizer ESI source.

## Results

### Identification of urinary metabolites following grape pomace extracts consumption

In this work, sixteen PC metabolites were identified in the urine of the treated rats with PC-rich grape pomace. Their detection was based on a large database comprising all forms of PC metabolites found in the literature as native form or conjugated. For an optimal characterization, the metabolites found in the urine samples of young and control untreated rats were subtracted and thus eliminated from the analysis. Amongst the 16 detected metabolites, a total of 7 [M-H]<sup>-</sup> metabolites, 7 sulfated, 1 methylated and 1 glucuronidated were identified. The detected PC metabolites in the urine of all treated rats, after 6 and 14 months of treatment, are summarized in table 1. Figure 1 shows 2 representative chromatograms, (A) for control untreated rat and (B) for PC 5 treated rat after 14 months of treatment in which 11 PC metabolites were identified.

In our previous work, we studied the long-term impact of PC-rich grape pomace on rat GM and we found that the mixture of PC can inhibit non beneficial bacteria from the rat microbiota and potentiate the growth of probiotic ones [(Chacar *et al.*, 2018)]. During this work, we looked to reveal the identity of the compounds and/or metabolites that could be responsible of the selective modulation of the rat gut microbiome. In fact, the biotransformation of PC depends on both their structure and the composition of the GM. It has been shown that particular species with certain genes for specific enzymes interfere in the biotransformation of PC, and the modulation of the GM depends on the resultant metabolites [(Popa *et al.*, 2017)].

In our study, some metabolites were detected in the urine during all the treatment period (e.g. homivanillic acid, ferulic acid, benzoic acid) and others fluctuated within the treatment (e.g. coumaric acid, genistein, valerolactone). 3-hydroxyphenylacetic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid were detected simultaneously and therefore correlated with the growth of *Bifidobacterium* in the rat GM as already observed [(Chacar *et al.*, 2018)]. In addition, the presence of Daidzedin metabolite, the phenolic sulfate derivative detected in the urine of all treated rats at 14 months post-treatment, could be responsible of the growth inhibition of *Clostridium* (Cluster I) that was observed after the same period of treatment.

## Discussion

From literature data results, Tzounis *et al.* showed an increase of growth of *Bifidobacterium* after inoculation with flavonols [(Tzounis *et al.*, 2008)]. Furthermore, a 50 mg/kg dose of de-alcoholised wine polyphenols consumed by carcinogen-treated rats for 16 weeks was associated with an increase of Bifidobacteria in the colon content [(Dolara *et al.*, 2005)]. In addition, Gwiazdowska *et al.* reported that some derivatives of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids enhanced the growth of *Bifidobacterium in vitro* [(Gwiazdowska *et al.*, 2015)]. In our work, we tried to correlate the presence of certain metabolites with the inhibition or the activation of GM growth. This could lead to a better understanding of PC metabolites mechanism of action *in vivo*. The detection of 3-hydroxyphenylacetic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid simultaneously with the growth of *Bifidobacterium* after consumption of PC 2.5 and PC 5 support the *in vitro* results of Gwiazdowska highlighting that phenolic acids derivatives enhance the growth of *Bifidobacterium*. These two metabolites could be mostly responsible of the growth of *Bifidobacterium* as they were not detected in the urine samples of rats fed with higher concentrations of PC (PC 10 and PC20) where no increase was observed in bifidobacterial count. The nonadditional effect observed at high concentrations could be related to a mechanism of saturation of PC derivatives in plasma [(Renouf *et al.*, 2013)].

As for *Clostridium* (Cluster I), the metabolic end products of caffeic acid (CFA) and chlorogenic acid (CGA) did not inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Clostridium perfringens* although the main precursors CFA and CGA were able to inhibit its growth during the minimum inhibitory concentration (MIC) testing respectively at 300 and 400 ppm [(Zaffarano, 2003)]. Antimicrobial activity of curcumin, coumarin, ellagic acid, (-) epicatechin and others have been reported following an MIC test for these compounds during 60 hours of incubation [(Cetin-Karaka and Newman, 2015)]. In our work, the absence of Daidzedin sulfate derivatives coincides with the elevated levels of *Clostridium* in all groups, and its detection in the urine of 14 months treated rats accords with the growth inhibition of *Clostridium* (Cluster I). To our knowledge, we are the first to identify an *in vivo* metabolite whose presence positively modulates GM. This effect could be due as well to its synergistic action with other metabolic end products identified in this work. Although no direct correlation was established between the presence of thirteen out of sixteen metabolites identified in this work and the rat GM modulation, these compounds may have synergistically exerted their effects as it was demonstrated in other studies. Dong *et al.* reported that a combination of daidzein and genistein was more effective on inducing apoptosis and inhibiting proliferation in prostate cancer cells than individual soy isoflavones at equivalent concentrations [(Dong *et al.*, 2013)]. As well, malvidin-3-glucoside mixed with other anthocyanins exhibited a synergistic effect in promoting beneficial microbes [(Hidalgo *et al.*, 2012)]. However, the exact mechanism of the synergistic effect that occurred remain poorly defined.

## Conclusion

The impact of long-term intake of PC on rat GM seems to be attributed, in part, to specific produced metabolites. The presence of both 3-hydroxyphenylacetic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid was directly correlated with the growth of *Bifidobacterium*. As for the phenolic sulfate derivative of Daidzedin, it was detected in the urine of rats at 14 months post-treatment. This perfectly correlates with the period when *Clostridium perfringens* growth was inhibited. It is to be mentioned that the occurred effects on the GM might be as well due to their additional synergistic collaboration with other biotransformed compounds. The quantification of the identified metabolites and the characterization of PC-rich grape

pomace metabolites in plasma would be interesting in order to better understand their biological health effects.

Table 1- Excretion of PC metabolites in urine after after 6 and 14 months of consumption of PC-rich grape pomace mixture .

		PC 2.5		PC 5		PC 10		PC 20	
		6 mo	14 mo	6 mo	14 mo	6 mo	14 mo	6 mo	14 mo
		pt	pt	pt	pt	pt	pt	pt	pt
M-1 derivatives	Coumaric acid	-	-	+	-	+	-	-	-
	Genistein	+	-	+	-	+	+	+	+
	Daidzedin	+	+	+	+	+	+	+	+
	Valerolactone	+	-	-	-	-	+	-	-
	Tyrosol	-	-	-	+	-	-	-	-
	Trans-cinnamic acid	-	-	-	+	-	-	-	+
	Apigenin	-	-	-	-	-	-	-	+
Phenolic sulfate derivatives	Pyrocatechol	+	+	+	+	+	+	+	+
	3-hydroxyphenylacetic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
	Homovanillic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ferulic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
	Enterolactone	-	-	-	-	-	-	-	+
	Benzoic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenolic methyl derivatives	Daidzedin	-	+	-	+	-	+	-	+
	3-hydroxyphenylacetic acid	+	+	+	+	-	-	-	-
	2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid	+	+	+	+	-	-	-	-

**Acknowledgments:** This work was supported by the Research Council of Saint Joseph Univ. of Beirut, Projects FS93 and FM281.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. The funding sponsor had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript and in the decision to publish the results.

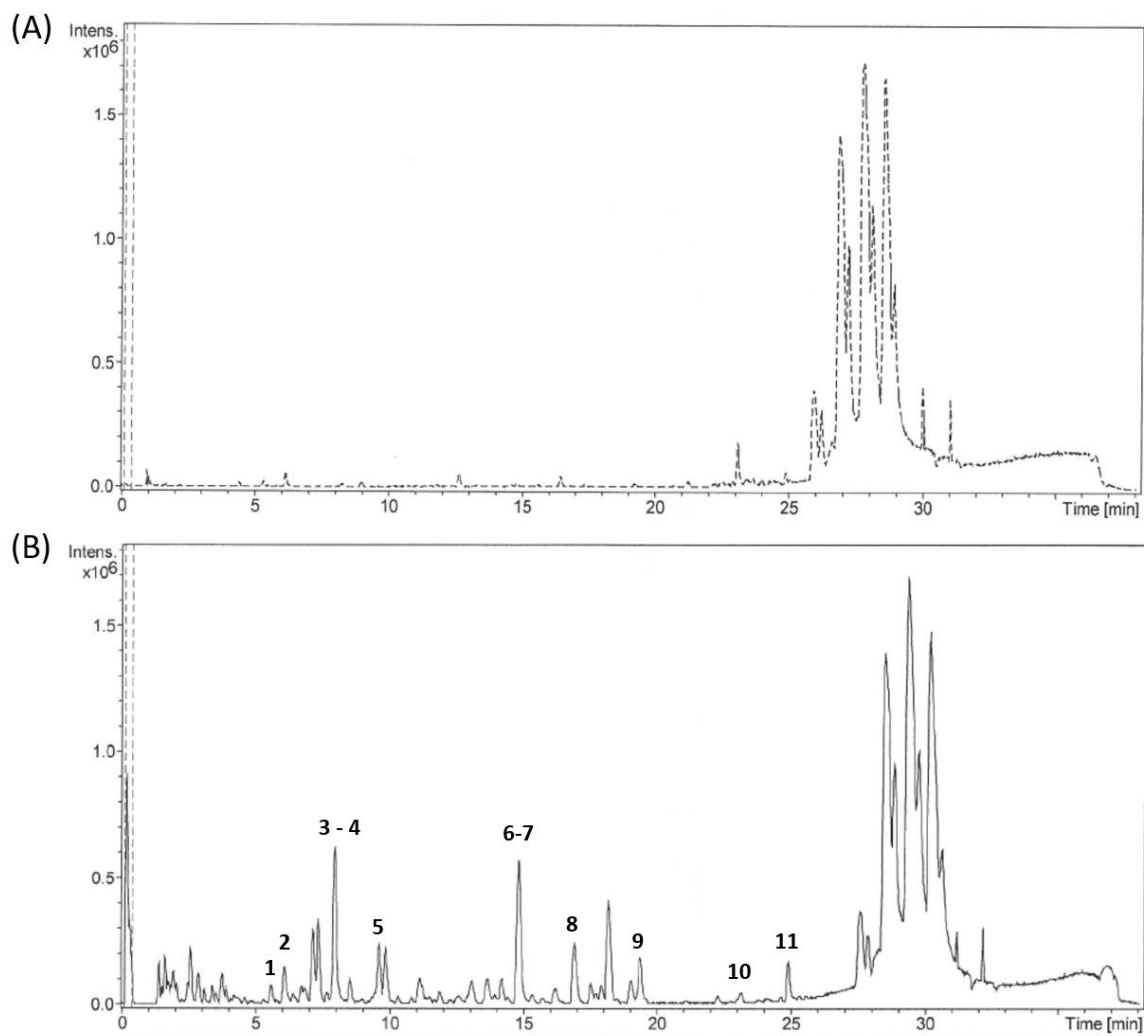
## References:

1. Feliciano, R. P.; Istas, G.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A., Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry. *Molecules* **2016**, *21* (9).
2. Gasperotti, M.; Passamonti, S.; Tramer, F.; Masuero, D.; Guella, G.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U., Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination? *ACS chemical neuroscience* **2015**, *6* (8), 1341-52.
3. Pimpao, R. C.; Dew, T.; Oliveira, P. B.; Williamson, G.; Ferreira, R. B.; Santos, C. N., Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61* (17), 4053-62.
4. Espin, J. C.; Gonzalez-Sarrias, A.; Tomas-Barberan, F. A., The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical pharmacology* **2017**, *139*, 82-93.
5. Chacar, S.; Itani, T.; Hajal, J.; Saliba, Y.; Louka, N.; Faivre, J. F.; Maroun, R.; Fares, N., The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. *Journal of food science* **2018**, *83* (1), 246-251.
6. Popa, D. E.; Dragoi, C. M.; Arsene, A. L.; Dumitrescu, I. B.; Nicolae, A. C.; Velescu, B. S.; Burcea-Dragomiroiu, G. T. A., The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota. *INTECH* **2017**.
7. Tzounis, X.; Vulevic, J.; Kuhnle, G. G.; George, T.; Leonczak, J.; Gibson, G. R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J. P., Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *The British journal of nutrition* **2008**, *99* (4), 782-92.
8. Dolara, P.; Luceri, C.; De Filippo, C.; Femia, A. P.; Giovannelli, L.; Caderni, G.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cresci, A., Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation research* **2005**, *591* (1-2), 237-46.
9. Gwiazdowska, D.; Jus, K.; Jasnowska-Malecka, J.; Kluczynska, K., The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth. *Acta biochimica Polonica* **2015**, *62* (4), 895-901.
10. Renouf, M.; Marmet, C.; Guy, P. A.; Beaumont, M.; Lepage, M.; Williamson, G.; Dionisi, F., Dose-response plasma appearance of green tea catechins in adults. *Molecular nutrition & food research* **2013**, *57* (5), 833-9.
11. Zaffarano, J. I. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF TWO COMMON FOOD PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR EFFECT ON THE MICROBIAL ECOLOGY OF SWINE FECES IN VITRO University of Kentucky 2003.
12. Cetin-Karaka, H.; Newman, M. C., Antimicrobial Efficacy of Natural Phenolic Compounds against Gram Positive Foodborne Pathogens. *Journal of Food Research* **2015**, *4* (6), 14-27.
13. Dong, X.; Xu, W.; Sikes, R. A.; Wu, C., Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food chemistry* **2013**, *141* (3), 1923-33.
14. Hidalgo, M.; Oruna-Concha, M. J.; Kolida, S.; Walton, G. E.; Kallithraka, S.; Spencer, J. P.; de Pascual-Teresa, S., Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012**, *60* (15), 3882-90.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Figure 1**



**Figure legend**

**Figure 1. LC/MS chromatogram for rats' urine samples: (A) control untreated rat and (B) PC 5 treated rat after 14 months of treatment.** The identified metabolites in chromatogram B are: **1.** Tyrosol, **2.** Pyrocatechol-sulfate, **3.** Homovanillic acid-sulfate, **4.** Ferulic acid, **5.** Daidzedin-sulfate, **6.** Benzoic acid-sulfate, **7.** 3-hydroxyphenylacetic acid-sulfate, **8.** Daidzedin, **9.** 3-hydroxyphenylacetic acid- methyl, **10.** trans-cinnamic acid, **11.** 2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid-glucuronide.

#### IV. Discussion

Dans cette étude, nous rapportons les effets des CP sur le vieillissement du cœur, du rein et du microbiote intestinal. D'après la littérature, nous avons constaté qu'aucune étude n'a évalué jusqu'à présent l'effet des CP *in vivo* à long terme sur les conséquences du remodelage lié au vieillissement. Ainsi, nous avons fixé les objectifs de notre étude, à savoir évaluer si un mélange de CP incorporé à la diète alimentaire pouvait améliorer l'état physiologique d'un organisme au cours du vieillissement.

La plus grande partie de cette thèse est celle qui couvre l'effet des CP administrés à long terme aux rats sur le vieillissement cardiovasculaire. Plusieurs études ont constamment montré que la consommation des CP est associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Rasines-Perea and Teissedre, 2017). Cependant, aucune étude n'a évalué *in vivo* à long terme les effets cardiaques de doses chroniques d'un mélange de CP.

Les rats contrôles âgés de 17 mois ont révélé une augmentation prononcée de la chambre ventriculaire et de la paroi postérieure, un effet non observé chez les groupes traités par les CP à une concentration  $> 2.5$  mg/kg/jour. Le remodelage des chambres cardiaques est une caractéristique de la senescence du cœur avec l'âge (Lakatta and Levy, 2003). Certains CP tels que le RVT et le dérivé synthétique du flavonoïde S17834 ont démontré des effets bénéfiques contre le développement du remodelage de la chambre cardiaque mais dans des conditions pathologiques spécifiques non liées au vieillissement (Thandapilly *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2012). Le vieillissement cardiaque est également caractérisé par le déclin de la fraction d'éjection et de la fraction de raccourcissement (Boluyt *et al.*, 2004). Nous avons confirmé dans notre étude l'effet de l'âge sur la performance cardiaque, alors qu'aucune diminution significative n'a été observée chez les groupes traités par les CP à une concentration  $> 2.5$  mg/kg/jour. Il nous semble que la consommation quotidienne de CP est donc capable de protéger le cœur du remodelage et de la régression de la performance fonctionnelle associés à l'âge.

Plusieurs études ont montré une stimulation des voies de signalisation hypertrophiques dans un cœur âgé, plus précisément NFATc3/calcineurine (Dai *et al.*, 2009), ERK1/2 (Liao *et al.*, 2015), CAMKII (Nattel, 2018) et GSK 3 $\beta$  (Fallah *et al.*, 2011). Ces effets ont été confirmés dans notre modèle. D'autre part, la stimulation de ces voies n'est pas nécessairement associée à une



augmentation de la masse du cœur. Le rapport masse du cœur sur la longueur du tibia est resté invariable avec l'âge, et ceci a été déjà expliqué par un équilibre entre la mort des myocytes et l'hypertrophie myocytaire réactive (Anversa *et al.*, 1986). Il a été démontré que le resvératrol (RVT) est capable de prévenir l'hypertrophie induite par le stress (Dolinsky *et al.*, 2015), mais aucune étude n'a évalué à long terme l'effet d'un mélange de CP sur l'hypertrophie cardiaque induite par l'âge. Nos résultats montrent clairement que les concentrations des CP étaient capables d'atténuer de manière dose-dépendante l'effet de l'âge sur les régulateurs clés de signalisation de l'hypertrophie cardiaque.

Nos résultats montrent également une augmentation significative de la CRP et de l'IL-6 plasmatiques ainsi que des infiltrats leucocytaires dans les myocards de rats témoins comparés à ceux traités par les CP, suggérant que le traitement chronique par les CP a protégé le cœur contre l'inflammation. La CRP et l'IL-6 sont des marqueurs inflammatoires plasmatiques qui augmentent avec le vieillissement cardiaque et leur sécrétion est souvent prédictive d'évènements cardiovasculaires successifs tels que le syndrome coronarien aigu (Franceschi and Campisi, 2014; Wang *et al.*, 2014). Il a été démontré que le RVT réprime la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages murins en modulant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Ma *et al.*, 2015). En parallèle, la voie inflammatoire P38 est sur-exprimée dans les cœurs de rats contrôles, un effet qui n'est pas observé dans les cœurs de rats traités par les CP (CP 5, CP 10 et CP 20). Ceci corrobore les résultats de l'histologie et des marqueurs inflammatoires plasmatiques.

Le vieillissement augmente l'expression de TGF- $\beta$ , ce dernier joue un rôle important dans la synthèse et la sécrétion du collagène des fibroblastes cardiaques et contribue ainsi au raidissement du cœur (Nakou *et al.*, 2016). Il a été démontré que le kaempferol et les CP du yacon ont respectivement atténué la fibrose cardiaque dans un modèle de rat avec un mal fonctionnement du cœur induit par l'angiotensine II et dans un modèle de souris diabétique (Liu *et al.*, 2017; dos Santos *et al.*, 2018). Il faut néanmoins noter que ces expériences ont été réalisées dans des conditions pathologiques non liées au vieillissement, mais, nos résultats révèlent aussi que la consommation des CP protège le cœur de la fibrose au cours du vieillissement. En effet, les activités de Smad 2 et Smad 3 ainsi que la concentration plasmatique de TGF- $\beta$  ont été réduites dans le myocarde de rats consommant les CP. Nous avons pu également observer qu'un moindre

pourcentage de zone fibrotique a été détecté dans le myocarde de rats traités par les CP comparés aux contrôles. Ainsi une consommation de CP à long terme semble avoir empêché d'une manière dose-dépendante le développement de la fibrose cardiaque au cours du processus du vieillissement.

Enfin nous pouvons noter que le pourcentage des myocytes apoptotiques a été remarquablement réduit dans les groupes traités par les CP comparés aux contrôles, avec une expression accrue des enzymes antioxydantes SOD 1 et SOD 2. Cela confère aux CP un rôle protecteur important au cours du processus du vieillissement. En effet, habituellement, le vieillissement cellulaire est caractérisé par une augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), par l'apoptose et par l'accumulation de protéines et d'organites endommagés (Storz, 2006). De plus il est largement démontré que le stress oxydatif à long terme est associé à diverses maladies, en particulier les maladies cardiovasculaires (Petersen and Smith, 2016). Sheng et collaborateurs ont suggéré que le mécanisme de prévention de l'hypertrophie cardiaque par les CP de type flavonoïdes est lié à la régression de l'apoptose des cardiomyocytes et du stress oxydatif (Sheng *et al.*, 2009). Dans notre modèle, les effets bénéfiques des CP sur le remodelage cardiaque induit par l'âge sont supposés être dus à leur activité antioxydante. L'augmentation de SOD 1 et SOD 2 contrebalance probablement la production des ERO dans le tissu cardiaque et par conséquent réduit les lésions myocardiques.

Jusque-là, nous avons montré qu'une consommation régulière de CP permet de préserver le cœur du remodelage lié au vieillissement. De façon totalement indépendante et en utilisant des techniques d'investigation cellulaires et électrophysiologiques, une étude préliminaire a consisté à évaluer les effets aigus des CP sur les fibroblastes cardiaques de rat. Une étude réalisée visant à définir le rôle des canaux KATP Kir6.1 et Kir6.2 dans la protection médiée par le resvératrol contre la lésion myocardique dans un modèle de souris, a démontré par western-blot et immunohistochimie que le canal Kir6.2/KATP est indispensable pour l'effet cardioprotecteur médié par le RVT (Du *et al.*, 2014). Une autre étude a montré que l'activation des courants KATP des fibroblastes cardiaques d'un cœur infarci, exerce un effet cardioprotecteur (Benamer *et al.*, 2013). Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à voir l'effet du pinacidil sur l'activité du canal potassique des myofibroblastes ventriculaires de rats, et en deuxième temps visualiser l'effet des CP sur le courant.

Nous avons enregistré une conductance activée par le pinacidil et les CP qui était augmentée par les CP.

Cependant, la reproductibilité de l'activation du courant par le pinacidil seul nous a empêchés d'obtenir des résultats solides. Il est connu que, l'expression du canal potassique SUR2/Kir6.1 en culture a lieu lors de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Benamer *et al.*, 2009). Ces canaux semblent être absents sur les fibroblastes cardiaques et aucun courant n'est enregistré même si ces derniers sont exposés à un activateur du courant tel que le pinacidil (Benamer *et al.*, 2013). Un défaut de différenciation pourrait expliquer l'absence d'une activation régulière de courant dans nos cultures. La recherche des marqueurs de la différenciation telles que l' $\alpha$ -smooth muscular actine «  $\alpha$ -SMA » pourrait évaluer cette hypothèse, bien qu'il ne nous paraisse pas clairement pourquoi nos cellules ont montré des signes de variabilité aussi marquées.

Plus secondairement que sur le système cardiaque, l'effet de l'usage à long terme des CP sur le système rénal a été étudié dans notre modèle de rat. Dans l'introduction, nous avons vu que des études épidémiologiques suggèrent que le vieillissement du rein est associé à des changements structurels et à une perte de la fonction rénale (Yoon and Choi, 2014). La capacité des CP à réduire le remodelage rénal associé à l'âge a seulement été rapporté dans des conditions de stress (Anjaneyulu and Chopra, 2004; Tapia *et al.*, 2012) qui ne reflètent pas un vieillissement physiologique rénal. Nos résultats montrent une conservation de la structure du rein avec l'âge quel que soit le groupe et une augmentation significative du ratio albumine : créatinine (ACR) chez les rats âgés de 17 mois par rapport aux rats jeunes. Lim et collaborateurs en 2012 ont observé une albuminurie significativement plus élevée chez des souris âgées de 24 mois comparées à des souris jeunes (Lim *et al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec nos travaux néanmoins on observe une tendance chez les groupes de rats traités par les CP à empêcher le déclin de la fonction rénale.

Parallèlement à l'étude de l'impact des CP sur le remodelage cardiaque et rénal associé au vieillissement, l'effet à long terme des CP sur le microbiote intestinal a été étudié. En fait, le microbiote intestinal a fait l'objet d'une attention particulière dans cette étude qui a montré que les CP issus du marc de raisin et présentant une forte activité antioxydante, modulent sélectivement le microbiote intestinal vers un phénotype plus sain. Au cours du vieillissement, les changements observés dans le microbiote peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la santé de l'hôte (Tongeren 2005).

Habituellement, les variations associées à l'âge comprennent une réduction du nombre de *Bifidobacterium* (Arbolea *et al.*, 2016). Dans notre modèle, notre étude montre qu'aucune réduction n'est observée entre les rats contrôles âgés de 17 mois et les rats jeunes. Les rats ont vécu un vieillissement physiologique normal sans maladies intestinales prononcées, allergie, ou obésité, ce qui pourrait s'expliquer par la même abondance de *Bifidobacterium* quel que soit l'âge (Vaiserman *et al.*, 2017). Dans les groupes traités par CP 2.5 et CP 5, nous avons même observé une plus grande abondance de *Bifidobacterium*. L'effet non additif observé aux plus fortes concentrations (CP 10 et CP 20), pourrait être lié à un mécanisme de saturation. En effet, une consommation de faible et moyenne dose de thé vert riche en catéchine a exercé un effet significatif non observé à fortes doses, dû à la saturation à fortes doses des dérivés de la catéchine dans le plasma (Renouf *et al.*, 2013). Selon nos résultats de CLHP, la catéchine a été identifiée et quantifiée dans notre poudre. Par conséquent, une consommation d'une matrice alimentaire riche en CP semble être dans certains cas, dépendante de la dose administrée et spécifique à chaque métabolite produit dans le plasma (Lorenzo and Munekat, 2016).

Bien que *Clostridium* (cluster I) soit un constituant normal de la flore intestinale, une fois surpeuplée à long terme, cette bactérie devient responsable d'infections graves (Lakshminarayanan *et al.*, 2013). Avec l'âge, nous avons observé une augmentation significative de cette bactérie chez les rats contrôles ; en revanche, 14 mois de traitement par les CP quelle que soit la concentration utilisée, a empêché l'augmentation observée avec l'âge.

Une réduction de *Lactobacillus* avec l'âge peut résulter d'une réduction générale de la diversité des espèces ou des modifications de la physiologie digestive (Woodmansey, 2007). Nos résultats montrent que chez les rats contrôles, l'abondance de *Lactobacillus* a significativement

diminué par rapport aux jeunes, un effet également observé chez les groupes consommant les CP. Cette réduction observée dépend de la nature et des concentrations des métabolites qui ont atteints les tissus cibles (Noratto *et al.*, 2014). Des études *in vivo* et *in vitro* ont révélé une augmentation ou une réduction de la croissance de *Lactobacillus* en fonction du précurseur de CP ou du métabolite CP utilisé. L'abondance relative a augmenté avec l'acide gallique, les proanthocyanidines, la punicalagine et le RVT ; cependant, la catéchine, l'epicatéchine et la quercétine n'ont pas exercé d'effet significatif (Ozidal *et al.*, 2016). Sous forme de mélange, l'activité de certains CP peut être masquée par d'autres, ce qui rend difficile la compréhension de l'effet synergique exact qui peut se produire.

Aucune association entre l'âge et la diversité des populations d'entérocoques dans le microbiote fécal n'a été établie (Tedim *et al.*, 2015). Dans notre étude, aucun changement lié à l'âge n'a été observé pour *Enterococcus*, et les CP n'ont pas modulé la stabilité de cette espèce.

*Bacteroides* et le sous-groupe *Clostridium Leptum* sont des membres importants qui favorisent un vieillissement sain de la flore intestinale (Lopetuso *et al.*, 2013). Leurs niveaux ont significativement augmenté avec l'âge chez les contrôles et les groupes consommant les CP par rapport aux rats jeunes.

Suite aux effets exercés par les CP sur le microbiote intestinal en cours de vieillissement, nous nous sommes intéressés à identifier les métabolites urinaires produits après consommation des CP, et à établir le lien entre le devenir métabolique de ces composés et leur bioactivité sur le microbiote qui a été étudié précédemment.

Tzounis *et al.* ont montré une augmentation de la croissance de *Bifidobacterium* après inoculation de flavonols (Tzounis *et al.*, 2008). De plus, une consommation d'une dose de 50 mg/kg de polyphénols dans un vin non alcoolisé par des rats cancérogènes pendant 16 semaines était associée à une augmentation des bifidobactéries du côlon (Dolara *et al.*, 2005). *In vitro*, certains dérivés des acides hydroxycinnamique et hydroxybenzoïque ont augmenté la croissance de *Bifidobacterium* (Gwiazdowska *et al.*, 2015). Dans nos travaux, nous avons tenté de corrélérer la présence de certains métabolites avec l'inhibition ou la croissance du microbiote intestinal afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des CP *in vivo*. La détection de l'acide 3-

hydroxyphenylacétique et de l'acide 2-(4-hydroxyphenyl) propionique simultanément avec la croissance de *Bifidobacterium* après consommation de CP 2.5 et CP 5 soutient les résultats *in vitro* de Gwiazdowska révélant que les dérivés d'acides phénoliques favorisent la croissance de *Bifidobacterium*. Ces 2 métabolites pourraient être principalement responsables de la croissance de *Bifidobacterium* parce qu'ils n'ont pas été détectés dans les urines de rats traités par CP 10 et CP 20 chez lesquels aucune augmentation n'a été observée dans le nombre des bifidobactéries.

Les produits métaboliques de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique n'ont pas inhibé la croissance des bactéries pathogènes *Clostridium Perfringens*, bien que les principaux précurseurs aient inhibé leur croissance à une concentration environ de 350 ppm (Zaffarano, 2003). L'activité antimicrobienne du curcumin, de la coumarine, de l'acide ellagique et de l'épicatéchine a été rapportée après un test de concentration minimale inhibitrice pour ces composés pendant 60 heures d'incubation (Cetin-Karaka and Newman, 2015). D'après nos expérimentations, l'absence de dérivés sulfatés de daidzédine coïncide avec des taux élevés de *Clostridium* dans tous les groupes, en revanche, sa détection dans l'urine de rats traités pendant 14 mois s'accorde avec l'inhibition de croissance de cette bactérie. A notre connaissance, nous sommes les premiers à identifier *in vivo* un métabolite dont la présence module positivement le microbiote intestinal.

Bien qu'aucune corrélation directe n'ait été établie entre treize des seize métabolites identifiés dans ce travail et la modulation du microbiote intestinal chez le rat, leurs effets pourraient être dû à leur action synergique. Dong et collaborateurs ont rapporté qu'un mélange de daidzédine et de genistéine était plus efficace pour induire l'apoptose et inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de prostate comparé à un seul isoflavone de soja à des concentrations équivalentes (Dong *et al.*, 2013). Cependant, le mécanisme exact de l'effet synergique qui s'est produit reste mal défini.

## V. Conclusion et Perspectives

En conclusion finale, ce travail a mis en évidence, pour la première fois, qu'une consommation régulière de CP permet, sur le long terme, de préserver l'homéostasie de l'organisme et de limiter les effets de l'âge sur certaines fonctions physiologiques du rat :

- Sur le plan cardiaque, les CP ont permis de rétablir la performance cardiaque et de contrecarrer l'effet de l'âge sur l'hypertrophie, l'inflammation et la fibrose myocardiques, le tout démontré au niveau cellulaire et moléculaire ;
- Sur le microbiote intestinal, les CP semblent moduler sélectivement la population bactérienne vers un phénotype sain ;
- Sur le plan rénal, bien que les résultats restent préliminaires, les CP semblent protéger la fonction de l'organe avec un effet bénéfique qui prévient la détérioration induite par l'âge.

Le fait que nos résultats montrent qu'une consommation quotidienne de CP protège le cœur du remodelage associé au vieillissement, laisse augurer que l'apport quotidien dans notre alimentation de dérivés présentant les mêmes caractéristiques que les CP serait cardioprotecteur en retardant l'hypertrophie et la fibrose cardiaques et en préservant une performance fonctionnelle optimale. Ainsi, les CP représenteraient-ils une piste vers une pharmacologie protectrice du cœur ? Ou encore des agents naturels thérapeutiques antvieillessement au long terme ?

Le présent travail mérite d'être développé par de nombreuses approches et ouvre de nouvelles perspectives de recherche. Nous pouvons citer quelques pistes qu'il nous paraîtrait intéressant de développer

1. Nous avons administré les CP sous forme de mélange pour refléter leur consommation quotidienne dans des matrices alimentaires, mais il serait intéressant d'identifier quels CP sont effectivement responsables des effets observés et de rechercher des effets éventuellement synergiques. Il paraît donc intéressant de :
  - Caractériser les CP non identifiés dans la poudre.

- Identifier leurs métabolites circulants dans le sang et déterminer leurs concentrations physiologiques.
2. Il nous paraît par ailleurs important de poursuivre la caractérisation rénale au niveau cellulaire dans le but de rechercher des marqueurs précoces de la fonction glomérulaire stimulés ou inhibés par les CP au cours du vieillissement.
  3. Nos résultats en aigu sur les fibroblastes cardiaques requièrent que cette étude soit reprise. En effet, les CP sont connus pour exercer des effets aigus sur les cardiomyocytes depuis longtemps mais rien n'a été rapporté quant à leurs effets éventuels sur les tissus de soutien et les fibroblastes qui prennent de plus en plus d'importance dans la compréhension de la physiologie cardiaque (voir revue en annexe). Il nous faut donc élaborer de nouveaux protocoles expérimentaux cellulaires et électrophysiologiques afin d'évaluer précisément l'effet en aigu comme en chronique des CP sur la fonction des fibroblastes cardiaques (prolifération, différenciation, sécrétion) et sur leurs propriétés électrophysiologiques.
  4. Cette étude montre que les CP apportent des résultats prometteurs sur le vieillissement cardiaque mais qu'en est-il des capacités cognitives, mémorielles ou comportementales ? Nous avons au cours de notre étude conservé des prélèvements cérébraux qui devraient nous permettre d'étudier l'effet sur le long terme des CP sur le niveau d'expression de certains récepteurs de circuits de la mémoire, de l'apprentissage, du stress et/ou de plaisir, ainsi que certains marqueurs de vieillissement neuronal.

Les ouvertures qu'offre le présent travail ne se limitent pas aux 4 perspectives évoquées plus haut mais pourront également s'étendre sur d'autres systèmes biologiques de l'organisme en vue de sauvegarder une homéostasie équilibrée et efficace générales de l'individu avec l'âge. Il y a là un enjeu considérable pour nos sociétés qui se caractérisent par un vieillissement général de la population et pour qui la prise en charge des affections chroniques liées à l'âge se révèle déjà de première importance.



## VI. Références

- Achmon, Y., Harrold, D.R., Claypool, J.T., Stapleton, J.J., VanderGheynst, J.S., Simmons, C.W., 2016. Assessment of tomato and wine processing solid wastes as soil amendments for biosolarization. *Waste management* 48, 156-164.
- Aggarwal, N.T., Makielski, J.C., 2013. Redox control of cardiac excitability. *Antioxidants & redox signaling* 18, 432-468.
- Anderson, M.E., 2009. CaMKII and a failing strategy for growth in heart. *The Journal of clinical investigation* 119, 1082-1085.
- Aneja, R., Hake, P.W., Burroughs, T.J., Denenberg, A.G., Wong, H.R., Zingarelli, B., 2004. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Molecular medicine* 10, 55-62.
- Anjaneyulu, M., Chopra, K., 2004. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 31, 244-248.
- Anversa, P., Hiler, B., Ricci, R., Guideri, G., Olivetti, G., 1986. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *Journal of the American College of Cardiology* 8, 1441-1448.
- Arbolea, S., Watkins, C., Stanton, C., Ross, R.P., 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in microbiology* 7, 1204.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R., 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics* 5, 209-219.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition* 71, 1062-1076.
- Azevedo, P.S., Polegato, B.F., Minicucci, M.F., Paiva, S.A., Zornoff, L.A., 2016. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 106, 62-69.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191-203.
- Balke, C.W., Goldman, L., 2003. Excitation contraction coupling in cardiac muscle: is there a purely voltage-dependent component? *The Journal of general physiology* 121, 349-352.
- Benamer, N., Fares, N., Bois, P., Faivre, J.F., 2011. Electrophysiological and functional effects of sphingosine-1-phosphate in mouse ventricular fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 408, 6-11.
- Benamer, N., Moha ou, M.H., Demolombe, S., Cantereau, A., Delwail, A., Bois, P., Bescond, J., Faivre, J.F., 2009. Molecular and functional characterization of a new potassium conductance in mouse ventricular fibroblasts. *J.Mol.Cell Cardiol.* 46, 508-517.
- Benamer, N., Vasquez, C., Mahoney, V.M., Steinhardt, M.J., Coetzee, W.A., Morley, G.E., 2013. Fibroblast KATP currents modulate myocyte electrophysiology in infarcted hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 304, H1231-H1239.

- Beres, C., Costa, G.N.S., Cabezudo, I., da Silva-James, N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., Freitas, S.P., 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management* 68, 581-594.
- Berk, B.C., Fujiwara, K., Lehoux, S., 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation* 117, 568-575.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V., 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular plant pathology* 11, 705-719.
- Biernacka, A., Frangogiannis, N.G., 2011. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and disease* 2, 158-173.
- Boluyt, M.O., Converso, K., Hwang, H.S., Mikkor, A., Russell, M.W., 2004. Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. *Journal of applied physiology* 96, 822-828.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* 66, 209-215.
- Bouayed, J., Bohn, T., 2010. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3, 228-237.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci.Technol.* 28, 25-30.
- Brown, R.D., Ambler, S.K., Mitchell, M.D., Long, C.S., 2005. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 657-687.
- Callaghan, N.I., 2016. beta-Adrenergic augmentation of cardiac contractility is dependent on PKA-mediated phosphorylation of myosin-binding protein C and troponin I. *The Journal of physiology* 594, 4707-4708.
- Carlsson, M., Andersson, R., Bloch, K.M., Steding-Ehrenborg, K., Mosen, H., Stahlberg, F., Ekmebag, B., Arheden, H., 2012. Cardiac output and cardiac index measured with cardiovascular magnetic resonance in healthy subjects, elite athletes and patients with congestive heart failure. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 14, 51.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113 859–871.
- Cetin-Karaka, H., Newman, M.C., 2015. Antimicrobial Efficacy of Natural Phenolic Compounds against Gram Positive Foodborne Pathogens. *Journal of Food Research* 4, 14-27.
- Chacar, S., Itani, T., Hajal, J., Saliba, Y., Louka, N., Faivre, J.F., Maroun, R., Fares, N., 2018. The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. *Journal of food science* 83, 246-251.
- Chataigneau, T., Ndiaye, M., Schini-Kerth, V.B., 2003. Effets vasodilatateurs des composés polyphénoliques du vin : rôle de NO et EDHF. *STV* 15, 433-441.
- Chatelier, A., Mercier, A., Tremblier, B., Theriault, O., Moubarak, M., Benamer, N., Corbi, P., Bois, P., Chahine, M., Faivre, J.F., 2012. A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *J.Physiol* 590, 4307-4319.

- Chaturvedi, R.R., Herron, T., Simmons, R., Shore, D., Kumar, P., Sethia, B., Chua, F., Vassiliadis, E., Kentish, J.C., 2010. Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. *Circulation* 121, 979-988.
- Chen, C.C., Chow, M.P., Huang, W.C., Lin, Y.C., Chang, Y.J., 2004. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Molecular pharmacology* 66, 683-693.
- Chen, J.C., Ho, F.M., Pei-Dawn Lee, C., Chen, C.P., Jeng, K.C., Hsu, H.B., Lee, S.T., Wen Tung, W., Lin, W.W., 2005. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *European journal of pharmacology* 521, 9-20.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S., 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry : PPB* 72, 1-20.
- Choi, J.S., Choi, Y.J., Park, S.H., Kang, J.S., Kang, Y.H., 2004. Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *The Journal of nutrition* 134, 1013-1019.
- Christ, K.L., Burritt, R.L., 2013. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production* 53, 232-242.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Loggia, R.D., 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology* 116, 144-151.
- Costa, G., Francisco, V., Lopes, M.C., Cruz, M.T., Batista, M.T., 2012. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. *Current medicinal chemistry* 19, 2876-2900.
- Cowan, K.J., Storey, K.B., 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of experimental biology* 206, 1107-1115.
- Crescente, M., Jessen, G., Momi, S., Holtje, H.D., Gresele, P., Cerletti, C., de Gaetano, G., 2009. Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Thrombosis and haemostasis* 102, 336-346.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 43, 348-361.
- Dai, D.-F., Chen, T., Johnson, S.C., Szeto, H., Rabinovitch, P.S., 2012a. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1492-1526.
- Dai, D.F., Chen, T., Johnson, S.C., Szeto, H., Rabinovitch, P.S., 2012b. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1492-1526.
- Dai, D.F., Santana, L.F., Vermulst, M., Tomazela, D.M., Emond, M.J., MacCoss, M.J., Gollahon, K., Martin, G.M., Loeb, L.A., Ladiges, W.C., Rabinovitch, P.S., 2009. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation* 119, 2789-2797.

- Darvishi, S., Behnam, H., Pouladian, M., Samiei, N., 2013. Measuring Left Ventricular Volumes in Two-Dimensional Echocardiography Image Sequence Using Level-set Method for Automatic Detection of End-Diastole and End-systole Frames. *Research in cardiovascular medicine* 2, 39-45.
- de Magalhaes, J.P., 2013. How ageing processes influence cancer. *Nature reviews. Cancer* 13, 357-365.
- Deng, Y.H., Alex, D., Huang, H.Q., Wang, N., Yu, N., Wang, Y.T., Leung, G.P., Lee, S.M., 2011. Inhibition of TNF-alpha-mediated endothelial cell-monocyte cell adhesion and adhesion molecules expression by the resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene. *Phytotherapy research : PTR* 25, 451-457.
- Denic, A., Glassock, R.J., Rule, A.D., 2016. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Advances in chronic kidney disease* 23, 19-28.
- Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation research* 591, 237-246.
- Dolinsky, V.W., Soltys, C.-L.M., Rogan, K.J., Chan, A.Y.M., Nagendran, J., Wang, S., dyck, J.R.B., 2015. Resveratrol prevents pathological but not physiological cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 93, 413-425.
- Dong, X., Xu, W., Sikes, R.A., Wu, C., 2013. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food chemistry* 141, 1923-1933.
- dos Santos, K.C., Cury, S.S., Rodrigues Ferraz, A.C., Corrente, J.E., Gonçalves, B.M., de Araújo Machado, L.H., Carvalho, R.F., Nakamune, A.S., Fabro, A.T., Freire, P.P., Corrêa, C.R., 2018. Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Dostal, D., Glaser, S., Baudino, T.A., 2015. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Comprehensive Physiology* 5, 887-909.
- Du, R.H., Dai, T., Cao, W.J., Lu, M., Ding, J.H., Hu, G., 2014. Kir6.2-containing ATP-sensitive K(+) channel is required for cardioprotection of resveratrol in mice. *Cardiovascular diabetology* 13, 35.
- Dutra, R.L.T., Dantas, A.M., Marques, D.A., Batista, J.D.F., Meireles, B., de Magalhaes Cordeiro, A.M.T., Magnani, M., Borges, G., 2017. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food research international* 100, 650-657.
- Dzialo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., Kulma, A., 2016. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International journal of molecular sciences* 17, 160.
- Espin, J.C., Gonzalez-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F.A., 2017. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical pharmacology* 139, 82-93.
- Etxeberria, U., Fernandez-Quintela, A., Milagro, F.I., Aguirre, L., Martinez, J.A., Portillo, M.P., 2013. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 9517-9533.
- Eugenio-Perez, D., Medina-Fernandez, L.Y., Saldivar-Anaya, J.A., Molina-Jijon, E., Pedraza-Chaverri, J., 2016. Role of Dietary Antioxidant Agents in Chronic Kidney Disease.

- Fallah, M.P., Chelvarajan, R.L., Garvy, B.A., Bondada, S., 2011. Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors. *Mechanisms of ageing and development* 132, 274-286.
- Fares, E., Howlett, S.E., 2010. Effect of age on cardiac excitation-contraction coupling. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37, 1-7.
- Feliciano, R.P., Ista, G., Heiss, C., Rodriguez-Mateos, A., 2016. Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry. *Molecules* 21.
- Ferguson, M.A., Waikar, S.S., 2012. Established and emerging markers of kidney function. *Clinical chemistry* 58, 680-689.
- Fontana, L., Klein, S., 2007. Aging, adiposity, and calorie restriction. *Jama* 297, 986-994.
- Franceschi, C., Campisi, J., 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 Suppl 1, S4-9.
- Friedland, R.P., 2015. Mechanisms of molecular mimicry involving the microbiota in neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 45, 349-362.
- Fukuta, H., Little, W.C., 2008. The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart failure clinics* 4, 1-11.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., Steinkuhler, C., 2007. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell research* 17, 195-211.
- Garcia-Lomillo, J., Gonzalez-SanJose, M.L., 2016. Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1-20.
- Gasperotti, M., Passamonti, S., Tramer, F., Masuero, D., Guella, G., Mattivi, F., Vrhovsek, U., 2015. Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination? *ACS chemical neuroscience* 6, 1341-1352.
- Gjesdal, O., Bluemke, D.A., Lima, J.A., 2011. Cardiac remodeling at the population level—risk factors, screening, and outcomes. *NATURE REVIEWS | CARDIOLOGY* 8, 673-685.
- Gomes, I.B., Porto, M.L., Santos, M.C., Campagnaro, B.P., Gava, A.L., Meyrelles, S.S., Pereira, T.M., Vasquez, E.C., 2015. The protective effects of oral low-dose quercetin on diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice. *Frontiers in physiology* 6, 247.
- Grossman, W., Paulus, W.J., 2013. Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling. *The Journal of clinical investigation* 123, 3701-3703.
- Gunasekaran, U., Gannon, M., 2011. Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Ageing* 3, 565-575.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Gwiazdowska, D., Jus, K., Jasnowska-Malecka, J., Kluczynska, K., 2015. The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth. *Acta biochimica Polonica* 62, 895-901.
- Gyongyosi, M., Winkler, J., Ramos, I., Do, Q.T., Firat, H., McDonald, K., Gonzalez, A., Thum, T., Diez, J., Jaisser, F., Pizard, A., Zannad, F., 2017. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *European journal of heart failure* 19, 177-191.
- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences* 11, 1365-1402.

- Heineke, J., Molkentin, J.D., 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 589-600.
- Hidalgo, M., Oruna-Concha, M.J., Kolida, S., Walton, G.E., Kallithraka, S., Spencer, J.P., de Pascual-Teresa, S., 2012. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 3882-3890.
- Horakova, L., 2011. Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdisciplinary toxicology* 4, 114-124.
- Horn, M.A., Trafford, A.W., 2016. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of molecular and cellular cardiology* 93, 175-185.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* 126, 1821-1835.
- Jafri, M.S., 2012. Models of excitation-contraction coupling in cardiac ventricular myocytes. *Methods in molecular biology* 910, 309-335.
- Jakob, F., Seefried, L., Schwab, M., 2014. Alter und Osteoporose. *Internist*.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology* 21, 8787-8803.
- Kafantaris, I., Stagos, D., Kotsampasi, B., Hatzis, A., Kypriotakis, A., Gerasopoulos, K., Makri, S., Goutzourelas, N., Mitsagga, C., Giavasis, I., Petrotos, K., Kokkas, S., Goulas, P., Christodoulou, V., Kouretas, D., 2017. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 1-10.
- Kehat, I., Davis, J., Tiburcy, M., Accornero, F., Saba-El-Leil, M.K., Maillet, M., York, A.J., Lorenz, J.N., Zimmermann, W.H., Meloche, S., Molkentin, J.D., 2011. ERK1/2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circulation research* 108.
- Kehat, I., Molkentin, J.D., 2010. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* 122, 2727-2735.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18, 2328-2375.
- Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., Tai, T.C., 2013. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients* 5, 3779-3827.
- Kim, H., Hwang, J.S., Woo, C.H., Kim, E.Y., Kim, T.H., Cho, K.J., Kim, J.H., Seo, J.M., Lee, S.S., 2008. TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. *Experimental & molecular medicine* 40, 167-175.
- Klatte, T., Ficarra, V., Gratzke, C., Kaouk, J., Kutikov, A., Macchi, V., Mottrie, A., Porpiglia, F., Porter, J., Rogers, C.G., Russo, P., Thompson, R.H., Uzzo, R.G., Wood, C.G., Gill, I.S., 2015. A Literature Review of Renal Surgical Anatomy and Surgical Strategies for Partial Nephrectomy. *European urology* 68, 980-992.
- Kong, P., Christia, P., Frangogiannis, N.G., 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 549-574.
- Kubin, A.M., Skoumal, R., Tavi, P., Konyi, A., Perjes, A., Leskinen, H., Ruskoaho, H., Szokodi, I., 2011. Role of reactive oxygen species in the regulation of cardiac contractility. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 884-893.
- Kumar, M., Babaei, P., Ji, B., Nielsen, J., 2016. Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. *Nutrition and healthy aging* 4, 3-16.

- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal* 2013, 162750.
- Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 107, 490-497.
- Lakshminarayanan, B., Harris, H.M., Coakley, M., O'Sullivan, O., Stanton, C., Pruteanu, M., Shanahan, F., O'Toole, P.W., Ross, R.P., consortium, E., 2013. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from the faecal microbiota of elderly Irish subjects. *Journal of medical microbiology* 62, 457-466.
- Larrosa, M., Yanez-Gascon, M.J., Selma, M.V., Gonzalez-Sarrias, A., Toti, S., Ceron, J.J., Tomas-Barberan, F., Dolara, P., Espin, J.C., 2009. Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 2211-2220.
- Liao, P.H., Hsieh, D.J., Kuo, C.H., Day, C.H., Shen, C.Y., Lai, C.H., Chen, R.J., Padma, V.V., Kuo, W.W., Huang, C.Y., 2015. Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget* 6, 35383-35394.
- Lim, J.H., Kim, E.N., Kim, M.Y., Chung, S., Shin, S.J., Kim, H.W., Yang, C.W., Kim, Y.S., Chang, Y.S., Park, C.W., Choi, B.S., 2012. Age-associated molecular changes in the kidney in aged mice. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 171383.
- Liu, Y., Gao, L., Guo, S., Liu, Y., Zhao, X., Li, R., Yan, X., Li, Y., Wang, S., Niu, X., Yao, L., Zhang, Y., Li, L., Yang, H., 2017. Kaempferol Alleviates Angiotensin II-Induced Cardiac Dysfunction and Interstitial Fibrosis in Mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 43, 2253-2263.
- Lopetuso, L.R., Scaldaferri, F., Petito, V., Gasbarrini, A., 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens* 5, 23.
- Lopez-Candales, A., Hernandez Burgos, P.M., Hernandez-Suarez, D.F., Harris, D., 2017. Linking Chronic Inflammation with Cardiovascular Disease: From Normal Aging to the Metabolic Syndrome. *Journal of nature and science* 3.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- Lorenzo, J.M., Muneke, P.E.S., 2016. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (8), 709-719.
- Luisada, A.A., MacCanon, D.M., 1972. The phases of the cardiac cycle. *American heart journal* 83, 705-711.
- Lunde, I.G., Kvaloy, H., Austbo, B., Christensen, G., Carlson, C.R., 2011. Angiotensin II and norepinephrine activate specific calcineurin-dependent NFAT transcription factor isoforms in cardiomyocytes. *Journal of applied physiology* 111, 1278-1289.
- Ma, C., Wang, Y., Dong, L., Li, M., Cai, W., 2015. Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF-kappaB and JAK/STAT signaling pathways. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 207-213.
- Maatta-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., Gonzalez-Paramas, A.M., Torronen, A.R., 2004. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 4477-4486.
- Macian, F., 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology* 5, 472-484.

- Mackenzie, G.G., Carrasquedo, F., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2004. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 167-169.
- Manabe, I., Shindo, T., Nagai, R., 2002. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circulation research* 91, 1103-1113.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.
- Marin, L., Miguelez, E.M., Villar, C.J., Lombo, F., 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international* 2015, 905215.
- Maroun, R.G., Rajha, H.N., El Darra, N., El Kantar, S., Chacar, S., Debs, E., Vorobiev, E., Louka, N., 2018. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. Chapter 8 in *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier Inc. , 265-293.
- Maroun, R.G., Rajha, H.N., Vorobiev, E., Louka, N., 2017. Emerging Technologies for the Recovery of Valuable Compounds From Grape Processing By-Products-Grape Processing By-Products.
- Martin-Fernandez, B., Gredilla, R., 2016. Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age* 38, 225-238.
- Meehan, C.J., Langille, M.G., Beiko, R.G., 2015. Frailty and the Microbiome. *Interdisciplinary topics in gerontology and geriatrics* 41, 54-65.
- Mendes, A.B., Ferro, M., Rodrigues, B., Souza, M.R., Araujo, R.C., Souza, R.R., 2012. Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly. *Medicina* 72, 216-220.
- Meschiari, C.A., Ero, O.K., Pan, H., Finkel, T., Lindsey, M.L., 2017. The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *GeroScience* 39, 7-18.
- Min, K., Ebeler, S.E., 2008. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46, 96-104.
- Moon, M.K., Lee, Y.J., Kim, J.S., Kang, D.G., Lee, H.S., 2009. Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 32, 1371-1377.
- Moris, D., Spartalis, M., Spartalis, E., Karachaliou, G.S., Karaolani, G.I., Tsourouflis, G., Tsilimigras, D.I., Tzatzaki, E., Theocharis, S., 2017. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of translational medicine* 5, 326.
- Mudd, J.O., Kass, D.A., 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928.
- Muñoz, P., Morales, M.P., Mendivil, M.A., Juárez, M.C., Muñoz, L., 2014. Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction. *Construction and Building Materials* 71, 181-187.
- Munshi, N.V., 2012. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circulation research* 110, 1525-1537.



- Nakagawa, T., Yokozawa, T., Sano, M., Takeuchi, S., Kim, M., Minamoto, S., 2004. Activity of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate against oxidative stress in rats with adenine-induced renal failure. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 2103-2107.
- Nakou, E.S., Parthenakis, F.I., Kallergis, E.M., Marketou, M.E., Nakos, K.S., Vardas, P.E., 2016. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *International journal of cardiology* 209, 167-175.
- Nattel, S., 2018. Aging and Protein Kinase Activation: Is It the Missing Link Between Age and Atrial Fibrillation? *Circulation research* 122, 799-801.
- Noratto, G.D., Garcia-Mazcorro, J.F., Markel, M., Martino, H.S., Minamoto, Y., Steiner, J.M., Byrne, D., Suchodolski, J.S., Mertens-Talcott, S.U., 2014. Carbohydrate-Free Peach (*Prunus persica*) and Plum (*Prunus salicina*) [corrected] Juice Affects Fecal Microbial Ecology in an Obese Animal Model. *PLoS one* 9, e101723.
- O'Neal, W.T., Efird, J.T., Nazarian, S., Alonso, A., Michos, E.D., Szklo, M., Heckbert, S.R., Soliman, E.Z., 2017. Mitral annular calcification progression and the risk of atrial fibrillation: results from MESA. *European heart journal cardiovascular Imaging*.
- Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J.M., Anversa, P., 1991. Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation research* 68, 1560-1568.
- Olson, E.R., Naugle, J.E., Zhang, X., Bomser, J.A., Meszaros, J.G., 2005. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288, H1131-1138.
- Otto, C.M., 2004. Why Is Aortic Sclerosis Associated With Adverse Clinical Outcomes?\*. *Journal of the American College of Cardiology* 43, 176-178.
- Ozdal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., Capanoglu, E., 2016. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients* 8, 78.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.
- Panzella, L., Napolitano, A., 2017. Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications. *Antioxidants* 6.
- Paun, A., Danska, J.S., 2016. Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome. *Pediatric diabetes* 17, 469-477.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Andriantsitohaina, R., 2006. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free radical research* 40, 1054-1065.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., Sautebin, L., 2006. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric oxide : biology and chemistry* 15, 30-39.
- Petersen, K.S., Smith, C., 2016. Ageing-Associated Oxidative Stress and Inflammation Are Alleviated by Products from Grapes. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 6236309.
- Pignatelli, P., Ghiselli, A., Buchetti, B., Carnevale, R., Natella, F., Germano, G., Fimognari, F., Di Santo, S., Lenti, L., Violi, F., 2006. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis* 188, 77-83.
- Pimpao, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B., Santos, C.N., 2013. Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 4053-4062.

- Popa, D.E., Dragoi, C.M., Arsene, A.L., Dumitrescu, I.B., Nicolae, A.C., Velescu, B.S., Burcea-Dragomiroiu, G.T.A., 2017. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota. *INTECH*.
- Qin, F., Siwik, D.A., Luptak, I., Hou, X., Wang, L., Higuchi, A., Weisbrod, R.M., Ouchi, N., Tu, V.H., Calamaras, T.D., Miller, E.J., Verbeuren, T.J., Walsh, K., Cohen, R.A., Colucci, W.S., 2012. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circulation* 125, 1757-1764, S1751-1756.
- Queen, B.L., Tollefsbol, T.O., 2010. Polyphenols and aging. *Current aging science* 3, 34-42.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's Disease. *The new england journal of medicine*, 329-344.
- Quinones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research* 68, 125-131.
- Rainfray, M., Richard-Harston, S., Salles-Montaudon, N., Emeriau, J.P., 2000. Les effets du vieillissement sur la fonction rénale et leurs implications en pratique médicale. *Presse Med*, 1373-1378.
- Rajha, H.N., El Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R.G., Louka, N., 2014. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. *Food and Nutrition Sciences* 5, 397-409.
- Rasines-Perea, Z., Teissedre, P.L., 2017. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules* 22.
- Rehman, T., 2012. Role of the gut microbiota in age-related chronic inflammation. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 12, 361-367.
- Reis Giada, M.L., 2013. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power.
- Renouf, M., Marmet, C., Guy, P.A., Beaumont, M., Lepage, M., Williamson, G., Dionisi, F., 2013. Dose-response plasma appearance of green tea catechins in adults. *Molecular nutrition & food research* 57, 833-839.
- Richter, K., Kietzmann, T., 2016. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell and tissue research* 365, 591-605.
- Roux, P.P., Blenis, J., 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 320-344.
- Saint-Georges-Chaumet, Y., Edeas, M., 2016. Microbiota-mitochondria inter-talk: consequence for microbiota-host interaction. *Pathogens and disease* 74, ftv096.
- Salazar, N., Arboleya, S., Valdes, L., Stanton, C., Ross, P., Ruiz, L., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilan, C.G., 2014. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Frontiers in genetics* 5, 406.
- Sanduzzi Zamparelli, M., Compare, D., Coccoli, P., Rocco, A., Nardone, O.M., Marrone, G., Gasbarrini, A., Grieco, A., Nardone, G., Miele, L., 2016. The Metabolic Role of Gut Microbiota in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences* 17.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition* 45, 287-306.

- Schieber, A., 2016. Side Streams of Plant Food Processing As a Source of Valuable Compounds: Selected Examples. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*
- Sheng, R., Gu, Z.L., Xie, M.L., Zhou, W.X., Guo, C.Y., 2007. EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta pharmacologica Sinica* 28, 191-201.
- Sheng, R., Gu, Z.L., Xie, M.L., Zhou, W.X., Guo, C.Y., 2009. EGCG inhibits proliferation of cardiac fibroblasts in rats with cardiac hypertrophy. *Planta medica* 75, 113-120.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 299.
- Starling, E.H., 1899. The glomerular functions of the kidney. *The Journal of physiology* 24, 317-330.
- Steenman, M., Lande, G., 2017. Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophysical reviews* 9, 131-137.
- Storz, P., 2006. Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006, re3.
- Strait, J.B., Lakatta, E.G., 2012. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart failure clinics* 8, 143-164.
- Tangney, C.C., Rasmussen, H.E., 2013. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports* 15, 324.
- Tapia, E., Soto, V., Ortiz-Vega, K.M., Zarco-Marquez, G., Molina-Jijon, E., Cristobal-Garcia, M., Santamaria, J., Garcia-Nino, W.R., Correa, F., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., 2012. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 269039.
- Tapia, E., Zatarain-Barron, Z.L., Hernandez-Pando, R., Zarco-Marquez, G., Molina-Jijon, E., Cristobal-Garcia, M., Santamaria, J., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 20, 359-366.
- Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodriguez, C.M., Canton, R., Willems, R.J., Baquero, F., Coque, T.M., 2015. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Applied and environmental microbiology* 81, 1820-1831.
- Thandapilly, S.J., Wojciechowski, P., Behbahani, J., Louis, X.L., Yu, L., Juric, D., Kopilas, M.A., Anderson, H.D., Netticadan, T., 2010. Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *American journal of hypertension* 23, 192-196.
- Tirziu, D., Giordano, F.J., Simons, M., 2010. Cell communications in the heart. *Circulation* 122, 928-937.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G.G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G.R., Kwik-Urbe, C., Spencer, J.P., 2008. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *The British journal of nutrition* 99, 782-792.
- Vaiserman, A.M., Koliada, A.K., Marotta, F., 2017. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing research reviews* 35, 36-45.

- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C., 2009. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 27, 120-139.
- Varzakas, T., Zakyntinos, G., Verpoort, F., 2016. Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods* 5.
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., Winterhalter, P., 2012. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60, 929-933.
- Vincent, J.L., 2008. Understanding cardiac output. *Critical care* 12, 174.
- Wang, X.H., Liu, S.Q., Wang, Y.L., Jin, Y., 2014. Correlation of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome. *Genetics and Molecular Research* 13.
- Weinstein, J.R., Anderson, S., 2010. The aging kidney: physiological changes. *Advances in chronic kidney disease* 17, 302-307.
- Weishaar, R.E., Kobylarz-Singer, D.C., Quade, M.M., Kaplan, H.R., 1988. Role of Cyclic AMP in Regulating Cardiac Muscle Contractility: Novel Pharmacological Approaches to Modulating Cyclic AMP Degradation by Phosphodiesterase. *Drug Development Research* 12, 119-1129.
- WHO, 2017. Cardiovascular disease statistics
- Woodmansey, E.J., 2007. Intestinal bacteria and ageing. *Journal of applied microbiology* 102, 1178-1186.
- Wu, J., Xia, S., Kalionis, B., Wan, W., Sun, T., 2014. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *BioMed research international* 2014, 615312.
- Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology* 214, 199-210.
- Yoon, H.E., Choi, B.S., 2014. The renin-angiotensin system and aging in the kidney. *The Korean journal of internal medicine* 29, 291-295.
- Zacharof, M.P., 2017. Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept. *Waste Biomass Valor* 8, 1011-1025.
- Zaffarano, J.I., 2003. MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF TWO COMMON FOOD PHENOLIC COMPOUNDS AND THEIR EFFECT ON THE MICROBIAL ECOLOGY OF SWINE FECES IN VITRO University of Kentucky
- Zenebe, W., Pechanova, O., Andriantsitohaina, R., 2003. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiological research* 52, 425-432.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Chang, S., Antos, C.L., Hill, J.A., Olson, E.N., 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110, 479-488.
- Zhang, L., Zhu, M., Shi, T., Guo, C., Huang, Y., Chen, Y., Xie, M., 2017. Recovery of dietary fiber and polyphenol from grape juice pomace and evaluation of their functional properties and polyphenol compositions. *Food & function* 8, 341-351.
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., Wang, Z., 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). 113, 160-165.
- Zhao, Q.D., Viswanadhapalli, S., Williams, P., Shi, Q., Tan, C., Yi, X., Bhandari, B., Abboud, H.E., 2015. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFkappaB signaling pathways. *Circulation* 131, 643-655.
- Zhou, P., Pu, W.T., 2016. Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circulation research* 118, 368-370.

Zhuo, J.L., Li, X.C., 2013. Proximal nephron. *Comprehensive Physiology* 3, 1079-1123.

**VII. ANNEXE**

En parallèle à mes travaux de thèse, une revue parlant de l'origine des FCs, de leur morphologie, de leurs propriétés fonctionnelles, mécaniques et électrophysiologiques a été rédigée et publiée dans le journal « Journal of Cellular Physiology » en 2016. Cette revue est intitulée « Basic Signaling in Cardiac Fibroblasts ».

# Basic Signaling in Cardiac Fibroblasts

STÉPHANIE CHACAR,<sup>1,2</sup> NASSIM FARÈS,<sup>2</sup> PATRICK BOIS,<sup>1</sup> AND JEAN-FRANÇOIS FAIVRE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), Université de Poitiers, CNRS, Poitiers, France

<sup>2</sup>Laboratoire de recherche en Physiologie et Physiopathologie (LRPP), pôle technologie santé, Faculté de Médecine, Université Saint Joseph, Beyrouth, Liban

Cardiac fibroblasts are commonly known as supporting cells of the cardiac network and exert many essential functions that are fundamental for normal cardiac growth as well as for cardiac remodeling process during pathological conditions. This review focuses on the roles of cardiac fibroblasts in the formation and regulation of the extracellular matrix components, and in maintaining structural, biochemical and mechanical properties of the heart. Additionally, though considered as non-excitabile cells, we review the functional expression in cardiac fibroblasts of a wide variety of transmembrane ion channels which activity may contribute to key regulation of cardiac physiological processes. All together, cardiac fibroblasts which actively participate to fundamental regulation of cardiac physiology and physiopathology processes may represent pertinent targets for pharmacological approaches of cardiac diseases and lead to new tracks of therapeutic strategies.

J. Cell. Physiol. 232: 725–730, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

## The Cardiac Fibroblast

In the myocardium, besides cardiomyocytes, different cell types can be distinguished, including fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells (SMCs), and stem cells (Dostal et al., 2015). Cardiac fibroblasts (CFs) consist of the two-thirds of the cardiac cells population and play a crucial role as mediators of normal and pathological cardiac remodeling (Olson et al., 2005). In the following sections, we summarize current insight into CFs origin and morphology, their structural and functional contribution to cardiac function, and highlight their electrophysiological properties and cell communication in the heart.

## Origin of Cardiac Fibroblasts

Fibroblasts are defined as cells of mesenchymal origin that produce collagen and extracellular matrix (ECM) proteins (Dostal et al., 2015). The epithelial cells derived from the proepicardial organ differentiate into mesenchymal stem cells via epithelial mesenchymal transition and subsequently into fibroblasts under the influence of growth factors, including platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), and transforming growth factor (TGF) (Olivey et al., 2006). These epicardial-derived cells do not however represent all the CFs, the remaining CFs can be produced as well by mesoangioblasts known as multipotent progenitors that can differentiate to endothelial cells of fibroblasts (Souders et al., 2009). On the other hand, fibroblasts may be derived from perivascular cells (Krenning et al., 2010).

After birth, the number of fibroblasts continues to expand; the cells grow and differentiate with increasing heart size. Once the heart has fully developed in a normal cardiac condition, the turnover of the fibroblasts is low (Olson et al., 2005). Contrarily, under pathological conditions, fibroblasts can arise from fibrocytes. Fibrocytes are distinct cell type that constitute 0.1–0.5% of peripheral blood cells and exhibit both monocytes and fibroblast-like characteristics such as the expression of collagen type I, fibronectin, CD11b, CD34, and CD45 (Wynn, 2008).

## Morphology of Cardiac Fibroblastic Cells

The fibroblasts are widespread throughout the body, but their morphology in the heart differs from all the other tissues

(Drake et al., 2003). In an adult heart, the volume of fibroblasts versus myocytes is not representative of their predominance; in fact, the number of CFs is approximately higher by twofold than the myocytes, they account for 70% of cardiac cells number. The CFs are recognizable by their shape; they are elongated with highly elaborated endoplasmic reticulum and do not have a basement membrane unlike the other cardiac permanent cell types. CFs form a three-dimensional collagen network and have the ability to detect and react to chemical, electrical, and mechanical signals (Drake et al., 2003). CFs possess ultrastructural features described as follow: the cytoplasm comprises vesicles, vacuoles and mitochondria with relatively few intermediate filaments; they possess as well a Golgi apparatus and abundant cytoplasmic granular components. The nucleus is round, slightly oval and contains a nucleolus (Baudino et al., 2006).

The organization of the fibroblasts in the heart is crucial for their role in maintaining the ECM integrity and interfering in the dynamic and coordinated cell–cell and cell–matrix interactions. Thereby, CFs maintain a normal cardiac function by responding via a variety of stimuli (Kohl et al., 2005).

CFs can be characterized by markers expressed as well by other cell type. For instance, the Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2), is a commonly used fibroblast marker, it works as a collagen-binding tyrosine kinase receptor and is expressed as well by SMCs, hepatic cells and endothelial cells (Goldsmith et al., 2004; Camelliti et al., 2005). Another familiar marker is

Contract grant sponsor: Fondation de France.

\*Correspondence to: Jean-François Faivre, Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), Université de Poitiers, CNRS, Pôle Biologie Santé Bâtiment B36/B37, 1 Rue Georges Bonnet TSA 51106, 86073, POITIERS Cedex 9, France. E-mail: jean-francois.faivre@univ-poitiers.fr

Manuscript Received: 27 September 2016

Manuscript Accepted: 28 September 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 29 September 2016.

DOI: 10.1002/jcp.25624

the Fibroblast Surface Antigen (FSA), it acts as a fibronectin-binding molecule and is expressed by fibroblasts, monocytes and macrophages (Krenning et al., 2010).

#### Function of a Cardiac Fibroblast

Among several functions accomplished by a CF, many studies pointed specifically on its role in fibrosis (Dostal et al., 2015). However, the remodeling of the extracellular neighborhood by a CF while secreting ECM proteins, including collagens, proteoglycans, glycoproteins, proteases, cross-linking proteins, and enzymes (Fan et al., 2012) is related to other major roles. In order to add more accurate data to this field, new studies targeted the quantification of the mechanical effects of fibroblasts remodeling in engineered tissue constructs (Babaei et al., 2016). It has been shown that the fibroblastic cells have the potential to communicate through a viscoelastic ECM at higher frequencies, and are capable of absorbing and transmitting mechanical signals from one another at high ranges (Babaei et al., 2016).

CFs are known as well to secrete pro-inflammatory and profibrotic cytokines following a myocardial infarction (MI) (van Nieuwenhoven and Turner, 2013). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine-1 (IL-1), and Interleukine 6 (IL-6) are released subsequent to CFs activation, as well as for the matrix metalloproteinases (MMPs) stimulation and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) regulation (MacKenna et al., 2000; Turner et al., 2011). MMPs are a family of multigenic proteins that participate to both normal and pathological tissue remodeling (Corda et al., 2000). The prolonged activation of CFs is defined by increased proliferation and subsequent ECM secretion (Olson et al., 2005) which help to maintain the structural integrity of the heart (Brown et al., 2005). Despite the fact that these changes serve as an important reparative wound healing response, they shouldn't last for a long run, otherwise they become a prime cause for the accumulation of collagen, cardiac fibrosis, and loss of cardiac function (Gurtner et al., 2008).

The repair of wounds is one of the most complex biological processes in which the fibroblasts interfere to reduce the complications and repair the damaged ECM (Gurtner et al., 2008). In response to pro-inflammatory cytokines released at sites of injury, fibroblasts are capable of directed migration into the injury zone. Cardiotrophin-1, a member of the IL-6 family of cytokines, has been shown to stimulate rat CFs migration (Mitchell et al., 2007).

Cardiac fibroblasts can also differentiate into myofibroblasts (MFs), a cell type which become a secretome, that produces Ang II and a variety of fibrogenic growth factors such as FGF and TGF- $\beta$  (Baum and Duffy, 2011). Differentiating fibroblasts express contractile proteins, including alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), indicating acquisition of a secretory, myofibroblast phenotype (Porter and Turner, 2009).

To sum up, proliferation, migration and differentiation of CFs; ECM turnover, secretion of growth factors and cytokines by CFs are key elements in cardiac development and remodeling (Souders et al., 2009).

#### Fibrosis

Cardiac remodeling is an inescapable phase for a heart during its lifetime. During normal development, the heart undergoes some changes of its size, shape, and function (Manabe et al., 2002). The ECM, which is under the control of CFs in the normal heart, plays a crucial role in the natural remodeling process. Yet, during pathological conditions, the ECM is disproportionately secreted and degraded. Although increases in the ECM may be reparative, this imbalance could lead to non-desirable changes (Wynn, 2008). The ideal response is the replacement of regions of myocyte loss by a structural scar, but

in some cases, the increases in ECM deposition covers sites other than the primary injury. The whole mechanism would result in fibrosis (Dostal et al., 2015).

Malignant cardiac arrhythmias, such as atrial and ventricular fibrillation have been frequently associated to synthesis of fibrous tissue (Xu et al., 2004). The natural ageing process could be cited as well amongst the physio-pathological conditions that can induce a fibrosis, which in turn, may contribute to the development of diastolic dysfunction (Berk et al., 2007). Likewise, metabolic disorders as diabetes and obesity could be principle elements of fibrosis (Leonard et al., 2012).

Overall, we distinguish 2 types of fibrosis: reparative and reactive fibrosis. The excessive deposition of collagen in the ECM may completely replace a dead myocyte, this process is called reparative fibrosis. For the reactive one, it has been classified into the interstitial fibrosis where the fibrillary collagen appears in intermuscular spaces, and the perivascular fibrosis that refers to the accumulation of collagen within the adventitia of intramyocardial coronary arteries and arterioles. In this case neighboring myocytes are physically and electrically separated (Manabe et al., 2002). Both forms can be found in the same ventricle.

As actors of the reparative fibrosis in an infarcted heart, also the MFs differentiated from CFs have a strong ability to produce ECM proteins by modifying the balance of MMPs and their inhibitors TIMPs (Fan et al., 2012).

The consequences of fibrosis on cardiac function are numerous. An increased ECM synthesis causes a diastolic dysfunction and a mechanical stiffness. Furthermore, if this situation lasts for a long time, it can cause changes in gene expression associated with left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction (Brown et al., 2005; Chaturvedi et al., 2010).

In addition, inflammation and fibrosis in the perivascular areas reduce oxygen availability and nutrients causing localized hypoxia and myocyte ischemia (Krenning et al., 2010). The activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and increased levels of active TGF- $\beta$ 1 recruit smooth muscle cells, monocytes, and fibroblasts and stimulate a genetic program of wound repair and ECM deposition, leading to perivascular fibrosis and amplification of the profibrotic state (Berk et al., 2007).

The production of ECM components including fibrillar collagen, fibronectin, and proteoglycans by cardiac fibroblasts is induced in vitro by TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  which stimulates fibroblast proliferation and phenotypic conversion to MFs (Berk et al., 2007).

Finally, the accumulation of the ECM and the regulation of the balance of MMPs/TIMPs rely also on matricellular proteins that are expressed in normal and pathophysiological conditions. Their role stand to modulate the cell behavior and regulate an inflammation post cardiac injury. Matricellular proteins include the thrombospondins, tenascins, osteopontins, periostins and the secreted protein acid and rich in cysteine (SPARC) (Valiente-Alandi et al., 2016).

#### Mechanical Signaling

As in fibroblasts of the skin and tendons, CFs, respond under normal ECM (Holmes et al., 2005; Catalucci et al., 2008). Transmission of forces between fibroblasts and the ECM occurs through the cytoskeleton network.

In the normal myocardium, these forces are in equilibrium and therefore CFs undergo a low degree of tissue stiffness (Wells and Discher, 2008; Bhana et al., 2010). A number of different studies has demonstrated that mechanical stretch of CFs leads to a wave of events targeting the level of various ECM components; increase of MMPs, growth factors, cell surface ECM receptors (MacKenna et al., 2000; Ruwhof et al., 2000).



Much of the mechanosensing in CFs occurs through integrin family members. Integrin mediates fibroblast adherence to ECM components such as fibronectin, collagen and vitronectin, and are present in cell–cell adhesion with vascular cell adhesion molecule and intercellular adhesion molecule (Hynes, 1987). Additionally, integrins have been shown to interact with various extracellular ligands and vice versa, resulting in tremendous diversity and potential for functional redundancy (Chen, 2008; Schwartz and DeSimone, 2008).

Research has demonstrated that CFs express specific integrin including  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ , and  $\beta 5$  with multitude combinations, in which collagen, fibronectin, osteopontin and vitronectin are the primary ligand (Stawowy et al., 2005; Manso et al., 2009). Not only integrin participate in the mechanosensing process, angiotensin I receptor has been shown to be mechanically activated both in vitro and in vivo in the absence of angiotensin II (Zou et al., 2004) resulting in modulating the cytoskeleton proteins of CFs, ECM components, MMPs, as well as modulating the  $\beta 1$  integrin signaling (Lal et al., 2007). In addition to integrin and ATIR, a variety of other mechanoreceptor including stretch activated channels and transient receptor potential canonical channels (Pedersen and Nilius, 2007) can alter ECM synthesis and deposition by CFs (Weber, 2004).

A number of different mechanisms have been proposed in fibroblast force mechanotransduction, orchestrated through the activation of various signaling pathways: Rac1, RhoA, multiple kinases, Akt, calcineurin/NFAT, and Yap/Taz growth modulating hippo pathway (Pedersen and Nilius, 2007; Janmey et al., 2013).

### Chemical Signaling

CFs respond to a wide range of different stimuli. Many of these stimuli function as activators of CFs, making them as sentinel cells during cardiac development disease. Instead of the mechanotransduction signaling, CFs are known to express and to secrete cytokines, growth factors and other signaling molecules. These factors can act in a paracrine or autocrine manner and have an effect on all surrounding cardiac cell types. The regulation and expression of these specific factors is closely related to the type of stimulus that the fibroblast is responding to. The stimulus may be a pro- or anti-inflammatory cytokine and growth factor such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and pro-fibrotic TGF- $\beta$  observed in heart failure patients (Askevold et al., 2014; Frangogiannis, 2014) or it can be hypoxia, electrical signals, or mechanical stretch.

Because of the tremendous variety and complexity of systemic factors in vivo, it is difficult to delineate the precise contribution of each factor in heart failure. As mentioned above, inflammatory cytokines are one of the main molecules secreted by fibroblasts in the heart. IL-1 $\alpha$  is one of these factors that play a key role in cardiac remodeling and pathology (Long, 2001). Different ways are known to regulate IL-1 $\alpha$  balance. This includes, TNF- $\alpha$ , estrogen and direct cell–cell interactions (Long, 2001; Turner et al., 2007a). IL-1 $\alpha$  has a wide spectrum of biological action; indeed, IL-1 $\alpha$  promotes cell migration, collagen deposition and fibroblast proliferation (Mitchell et al., 2007; Bujak et al., 2008), leads to MMPs expression enhancement and can regulate other cytokines (IL-6) or growth factor (Tenascin C, CTGF) as well as transmembrane receptors (ATIR) in CFs (Turner et al., 2011; van Nieuwenhoven et al., 2013).

Angiotensin II is the effector hormone of the renin angiotensin system (RAS) (Davis and Roberts, 1997) that is important for blood pressure regulation. Local RAS has been demonstrated to exist in the normal and diseased heart, beside the circulatory RAS, playing a crucial role in cardiac (Kumar et al., 2008). Moreover, several studies have shown that

localized or intracellular RAS leads fibroblast to generate AngII (Sanghi et al., 2005) and thereby modulating collagen expression and secretion via ATIR (Gurtner et al., 2008). This is interesting because it gives quite an alternative way for therapeutic assay with the fibroblast.

Another bioactive agent shown to be important for cardiac function is IL-6. IL-6 is a pleiotropic cytokine that is important for numerous cell processes such as cell growth, angiogenesis, apoptosis, differentiation and survival in various cell types and organs, including the heart. In addition, many studies have indicated that IL-6 is a key element in cell–cell interaction that occurs between endothelial cells, fibroblast and cardiomyocytes (Camelliti et al., 2004; Banerjee et al., 2009). Previous works have demonstrated that a tight link exist between plasma TNF- $\alpha$  and heart failure, while other ones show that no such correlation is observed (Bozkurt et al., 1998; Putko et al., 2014). Furthermore, studies in vitro in human CFs, showed that IL-1 $\beta$  and IL-6 expression were increased by TNF- $\alpha$  (Bujak and Frangogiannis, 2007; Turner et al., 2007b). Moreover, MMP-2,  $\alpha$ SMA and TGF- $\beta$  expression seems to be upregulated with atrial fibrosis in rat hearts (Liew et al., 2013). Taken together, these studies further demonstrate the multiple levels of gene and protein expression that occur in the CF and the critical impact on cardiac function.

Another chemical signal that is produced by fibroblast in the diseased heart is TGF- $\beta$  (Bujak and Frangogiannis, 2007). TGF- $\beta$  is involved in multitude of biological processes, including cell proliferation, differentiation, migration, apoptosis and ECM synthesis (Barnard et al., 1990; Bonewald, 1999). Additionally, TGF- $\beta$  plays a role in phenotypic conversion of fibroblast to myofibroblast (Leask, 2007) by activating collagen synthesis and by increasing the expression of genes coding proteins involved in contraction. Furthermore, the question about TGF- $\beta$  if it promotes or inhibits proliferation in the heart, is still not well elicited (Drobnic et al., 2007; Li et al., 2008). Better investigation of cytokines and growth factor homeostasis may provide in the future novel therapeutic targets in the diseased heart.

### The Myofibroblast

In response to various mechanical, genetic and humoral cardiac insults, fibroblasts proliferate and become myofibroblasts (Hinz, 2007). Myofibroblasts are generally not found in healthy normal myocardium, with the exception of heart valve leaflets (Messier et al., 1994). In addition, cardiac myofibroblasts may also raise from progenitor stem cells in the heart or from the circulation. Myofibroblast distinguishes from quiescent fibroblast by a number of characteristic genes expression such as genes encoding for alpha-smooth muscle actin and transgelin (Mayer and Leinwand, 1997). Moreover, studies from Tomasek and colleagues, showed that there are two distinct types of myofibroblast, those that do not express alpha-smooth muscle actin, called proto-myofibroblast and those that do express alpha-smooth muscle actin, which should be made myofibroblast (Tomasek et al., 2002). It's still unclear whether protomyofibroblasts are a different cell type in vivo or a transitory phenotype not fully differentiated (Serini and Gabbiani, 1999). Several key factors were proposed to the formation of protomyofibroblast such as PDGF, ED-A, fibronectin and mechanical stress/tension signals (Martin, 1997; Hinz et al., 2001).

Myofibroblast is important for fibrosis and tissue repair. It constitutes the hallmark of pathophysiological cardiac remodeling (Zeisberg and Kalluri, 2013; Kong et al., 2014) through the secretion of matrix, ECM, cytokines and growth factors (Brown et al., 2005). Together, they will promote pathological cardiomyocyte hypertrophy which may finally lead to cardiomyocyte death and progressive deterioration of cardiac function (Chiong et al., 2011).

### Electrical Signaling

Though considered as non-excitabile cells because of the absence of action potential on isolated cells, fibroblasts have been reported to be able of functional expression of a wide variety of ion channels which activity may contribute to key regulation of cardiac physiological processes. Different laboratories have screened membrane of CFs and have characterized potassium, chloride, sodium, proton or non-selective conductances. These channels have been characterized not only in cultured linages of fibroblasts but also in cardiac fibroblasts isolated from human or animal cardiac biopsies and then maintained in culture upon appropriate conditions. The purpose of this chapter is to briefly review main electrophysiological data reported in the literature on these cells.

#### Specific cationic channels

Whereas membrane potential of CFs is found poorly polarized, various potassium conductances have been characterized in these cells. Reports from various laboratories described background as well as voltage dependent channels (Chilton et al., 2005; Shibukawa et al., 2005; Poulet et al., 2016). Different laboratories confirmed these findings and demonstrated the influence of these potassium conductances on fibroblast proliferation properties (Poulet et al., 2016). Molecular correlates for these conductances have been suggested as Kir3.3, Kir7.1, KCNJ2 (Qi et al., 2015), Kv4.1, Kv6.2, Kv11.3 genes (Li et al., 2009; Poulet et al., 2016). On another hand, potassium conductances which activation is regulated by intracellular or extracellular factors have been also described in CFs. Particular examples are given in the papers from Wang et al (Wang et al., 2013) which report the presence of calcium-activated potassium conductances and which may be involved in fibrosis process (confirmed by Li in cultured fibroblasts [Li et al., 2009]). Furthermore, in our lab, we have been able to demonstrate the existence of SUR2/Kir6.1 channels which are expressed as fibroblasts differentiate into myofibroblasts (Benamer et al., 2009). These channels seem to be closed in physiological conditions but activated by sphingosine-1-phosphate which is a marker of inflammatory stress (Benamer et al., 2011). Other labs have confirmed the activation of these channels in ischemia pathological models (Benamer et al., 2013). In vitro at least, the activation of these channels have been demonstrated to modulate fibroblast cell properties, such as migration, secretion and proliferation properties (Vasquez et al., 2011).

In the same way, beside potassium channels, voltage-dependent sodium channels have also been characterized in fibroblasts (Li et al., 2009; Chatelier et al., 2012; Poulet et al., 2016). As previously reported for SUR2/Kir6.1 channels, these channels are expressed as fibroblasts differentiate into myofibroblasts (Chatelier et al., 2012). Since Nav1.5 gene has been proposed as responsible for the functional expression of this sodium conductance, biophysical properties of these channels are similar to those classically obtained from excitable cardiac myocytes (Chatelier et al., 2012). It is not yet clearly established how such a permeability which is inactivated at depolarized potential may contribute to physiological or physiopathological processes in poorly polarized CFs. Poulet et al, while confirming the presence of a functional sodium channel in cardiac fibroblasts, especially when isolated from atrial fibrillated (AF) tissue, review different possibilities for the contribution of this sodium permeability to fibroblast physiology (Poulet et al., 2016). Anyway, the existence of such a permeability might be of major relevance when considering that modification of intracellular sodium concentration may have direct control of calcium homeostasis through the presence of exchangers responsible for sodium-calcium exchange in CFs

which has been accordingly demonstrated to affect properties of cardiac (myo)fibroblasts (Raizman et al., 2007).

Less classical specific cationic channels such as proton permeable channels have also been reported in CFs (El Chemaly et al., 2006). They are sensitive to the difference between external and internal pH and may modulate membrane potential of fibroblast according to metabolic state of these cells. Moreover, these voltage-gated proton channels are blocked by zinc. It may be anticipated that these channels may be of critical importance in situations of cardiac ischaemia.

#### Specific anionic channels

Chloride conductances have also been described in our lab and by others. Particularly, we have shown that intracellular calcium concentration increase can activate a chloride conductance in human cardiac fibroblasts that affects cardiac excitability properties of these cells (El Chemaly et al., 2014). We have identified ANO1 as the gene responsible for this conductance, and for the activation of chloride permeability in cardiac fibroblasts submitted to angiotensin stimulation through AT1 and PKC pathway (El Chemaly et al., 2014).

#### Non specific channels

It has long been known that stretch is able to influence membrane potential of CFs. Numerous studies from the laboratory of Kamkin have reported the existence of stretch activated changes in fibroblast membrane potential, participating to the mechanical electrical feedback which then influences cardiomyocyte cells behavior and thus may strongly influence global cardiac electrophysiological properties (Kamkin et al., 2003; Kamkin et al., 2005; Abramochkin et al., 2014). Nonspecific cationic channels have been proposed as responsible for this type of conductances (Kamkin et al., 2003). These findings have been completed by the identification of TRP channels in the membrane of CFs that may at least in part be responsible for the development of stretch sensitivity. Actually, many calcium-activated non-specific cationic TRP channels have been described in these cells. TRPC3, TRPC6, TRPM7 and TRPV4 have been reported to be involved in proliferation and differentiation of CFs (Du et al., 2010; Adapala et al., 2013). In 2010, TRPM7 which is a calcium and magnesium permeable TRP channel has been proposed as the main calcium entry pathway in myofibroblast cells at least in the atria (Du et al., 2010). Critically, it has been shown to be overexpressed in fibroblasts of the atria of patients showing atrial fibrillation, opening avenues toward the participation of CF excitability to the development of pathological remodeling.

#### Gap junctions

CFs have finally been shown to be electrically connected to neighbor cells through connexin conductances and specially Cx43 and Cx45 isoforms. These connections can be found either between fibroblasts or between fibroblasts and cardiomyocytes. Whereas the demonstration of such a relationship between neighbor cells seems to be clear in vitro (Chilton et al., 2007; Louault et al., 2008), further evidence is still necessary to bring regarding the functionality of this connectivity in vivo (Kohl and Gourdie, 2014; Nguyen et al., 2014). However, this communication might be of great physiological and pathological importance. It has been shown that fibroblasts can synchronize electrical activity of cardiac tissue through electrotonic interactions (Gaudesius et al., 2003). On another hand, it is established that cardiomyocytes conduction, membrane potential, and excitability properties are influenced by connection to neighboring CF (Lajiness and Conway, 2014; McArthur et al., 2015) and that fibroblast-induced

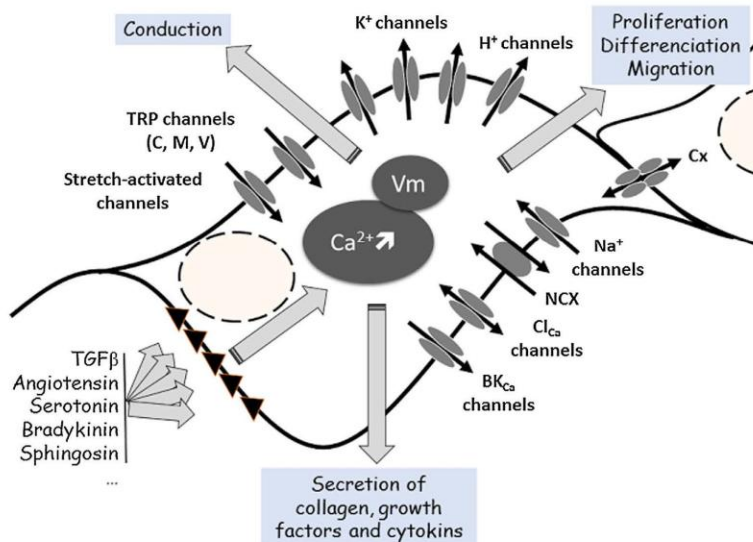


Fig. 1. Schematic representation of intracellular calcium and membrane potential control in cardiac fibroblasts in response to the activation of membrane receptors and ionic channels. Expected physiological consequences are indicated in grey panels.

depolarization of cardiomyocytes might promote the development of ectopic activity (Miragoli et al., 2007).

### Conclusion

Cardiac function is determined by the dynamic interaction of the overall cell population and the ECM of the heart. Amongst cardiac cells, CFs are known to have proper distinguished roles: Proliferation, migration and differentiation, ECM turnover, secretion of growth factors and cytokines are key elements in cardiac development and remodeling. As well, their presence is fundamental for the neighborhood cells since they exert their influence on cardiomyocytes function through paracrine communication and connexin conductances. Furthermore, we can draw a basic sketch of the present situation of CFs as proposed in Figure 1. These cells appear to be able of multiple ion exchanges between cells and between external and internal media. The diversity of these channels in such a non excitable cell may be taken into account when analyzing the physiological and pathophysiological impacts of pharmacological ion channel modulation in heart disease models. Indeed, the modulation of channel properties in fibroblasts has been clearly demonstrated to modulate fibroblast cell properties, such as cell migration, secretion and proliferation. In a more general way, it is well accepted that CFs may promote cardiac arrhythmogenesis by disrupting the normal electrical connectivity of cardiac tissue and by direct modulation of tissue conduction properties, the modulation of which opening promising antifibrotic new therapeutic strategies.

### Literature Cited

Abramochkin DV, Lozinsky IT, Kamkin A. 2014. Influence of mechanical stress on fibroblast-myocyte interactions in mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol* 70:27–36.  
 Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM, Thodeti CK. 2013. TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J Mol Cell Cardiol* 54:45–52.

Askevold ET, Gullestad L, Dahl CP, Yndestad A, Ueland T, Aukrust P. 2014. Interleukin-6 signaling, soluble glycoprotein 130, and inflammation in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 11:146–155.  
 Babaei B, Davarian A, Lee SL, Pryse KM, McConaughy WB, Elson EL, Genin GM. 2016. Remodeling by fibroblasts alters the rate-dependant mechanical properties of collagen. *Acta Biomaterialia* 37:28–37.  
 Banerjee I, Fuseler JW, Intwala AR, Baudino TA. 2009. IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1694–1704.  
 Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. 1990. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1032:79–87.  
 Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. 2006. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1015–1026.  
 Baum J, Duffy H. 2011. Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 57:376–379.  
 Benamer N, Fares N, Bois P, Faivre JF. 2011. Electrophysiological and functional effects of sphingosine-1-phosphate in mouse ventricular fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 408:6–11.  
 Benamer N, Moha ou MH, Demolombe S, Cantereau A, Delwall A, Bois P, Bescond J, Faivre JF. 2009. Molecular and functional characterization of a new potassium conductance in mouse ventricular fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 46:508–517.  
 Benamer N, Vasquez C, Mahoney VM, Steinhardt MJ, Coetzee WA, Morley GE. 2013. Fibroblast KATP currents modulate myocyte electrophysiology in infarcted hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H1231–1239.  
 Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 117:568–575.  
 Bhana B, Iyer RK, Chen WL, Zhao R, Sider KL, Likhitanichkul M, Simmons CA, Radisic M. 2010. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng* 105:1148–1160.  
 Bonewald LF. 1999. Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9:33–44.  
 Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. 1998. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97:1382–1391.  
 Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. 2005. The cardiac fibroblast: Therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:657–687.  
 Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. 2008. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* 173:57–67.  
 Bujak M, Frangogiannis NG. 2007. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74:184–195.  
 Camelliti P, Borg TK, Kohl P. 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65:40–51.  
 Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. 2004. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: Structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 94:828–835.  
 Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G. 2008. Physiological myocardial hypertrophy: How and why? *Front Biosci* 13:312–324.

- Chatelier A, Mercier A, Tremblier B, Theriault O, Moubarak M, Benamer N, Corbi P, Bois P, Chahine M, Faivre JF. 2012. A distinct de novo expression of Nav1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts. *J Physiol* 590:4307–4319.
- Chaturvedi RR, Herron T, Simmons R, Shore D, Kumar P, Sethia B, Chua F, Vassiliadis E, Kenish JC. 2010. Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. *Circulation* 121:979–988.
- Chen CS. 2008. Mechanotransduction—a field pulling together? *J Cell Sci* 121:3285–3292.
- Chilton L, Giles WR, Smith GL. 2007. Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J Physiol* 583:223–236.
- Chilton L, Ohya S, Freed D, George E, Drobnic V, Shibukawa Y, Macconnell KA, Imaizumi Y, Clark RB, Dixon IM, Giles WR. 2005. K<sup>+</sup> currents regulate the resting membrane potential, proliferation, and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H2931–2939.
- Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S. 2011. Cardiomyocyte death: Mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* 2:e244.
- Corda S, Samuel JL, Rappaport L. 2000. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 5:119–130.
- Davis GK, Roberts DH. 1997. Molecular genetics of the renin-angiotensin system: Implications for angiotensin II receptor blockade. *Pharmacol Ther* 75:43–50.
- Dostal D, Glaser S, Baudino TA. 2015. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol* 5:887–909.
- Drake MJ, Hedlund P, Andersson KE, Brading AF, Hussain I, Fowler C, Landon DN. 2003. Morphology, phenotype and ultrastructure of fibroblastic cells from normal and neuropathic human detrusor: Absence of myofibroblast characteristics. *J Urol* 169:1573–1576.
- Drobnic V, Cunningham RH, Bedosky KM, Raizman JE, Elmbarb VN, Rattan SG, Dixon IM. 2007. Differential and combined effects of cardioprotectin-1 and TGF-beta1 on cardiac myofibroblast proliferation and contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1053–1064.
- Du J, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H, Fusco D, Silverman D, Liang B, Yue L. 2010. TRPM7-mediated Ca<sup>2+</sup> signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res* 106:992–1003.
- El Chemaly A, Guinard R, Demion M, Fares N, Jebara V, Faivre JF, Bois P. 2006. A voltage-activated proton current in human cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 340:512–516.
- El Chemaly A, Norez C, Magaud C, Bescond J, Chatelier A, Fares N, Findlay I, Jayle C, Becq F, Faivre JF, Bois P. 2014. ANO1 contributes to angiotensin-II-activated Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> current in human atrial fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 68:12–19.
- Fan D, Takawala A, Lee J, Kassiri Z. 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:15.
- Frangogiannis NG. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nat Rev Cardiol* 11:255–265.
- Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S. 2003. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 93:421–428.
- Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO, Potts JD, Price RL, McFadden A, Rice M, Borg TK. 2004. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn* 230:787–794.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314–321.
- Hinz B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127:526–537.
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. 2001. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159:1009–1020.
- Holmes JW, Borg TK, Covell JW. 2005. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng* 7:223–253.
- Hynes RO. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48:549–554.
- Janney PA, Wells RG, Assoian RK, McCulloch CA. 2013. From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation* 86:112–120.
- Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G. 2003. Activation and inactivation of a non-selective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 57:793–803.
- Kamkin A, Kiseleva I, Lozinsky I, Wagner KD, Isenberg G, Scholz H. 2005. The role of mechanosensitive fibroblasts in the heart. In: Kamkin A, Kiseleva I, editors. *Mechanosensitivity in cells and tissues*. Moscow: Academia.
- Kohl P, Camelli P, Burton FL, Smith GL. 2005. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: Relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol* 38:45–50.
- Kohl P, Gourdie RG. 2014. Fibroblast-myocyte electrotonic coupling: Does it occur in native cardiac tissue? *J Mol Cell Cardiol* 70:37–46.
- Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 71:549–574.
- Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 225:631–637.
- Kumar R, Singh VP, Baker KM. 2008. The intracellular renin-angiotensin system: Implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:168–173.
- Lajiness JD, Conway SJ. 2014. Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 70:2–8.
- Lal H, Verma SK, Smith M, Guleria RS, Lu G, Foster DM, Dostal DE. 2007. Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: Differential regulation through beta 1-integrin and focal adhesion kinase. *J Mole Cell Cardiol* 43:137–147.
- Leask A. 2007. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74:207–212.
- Leonard BL, Smail BH, LeGrice JJ. 2012. Structural remodeling and mechanical function in heart failure. *Microsc Microanal* 18:50–57.
- Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP. 2009. Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS ONE* 4:e7307.
- Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF. 2008. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res* 102:185–192.
- Liew R, Khairunnisa K, Gu Y, Tee N, Yin NO, Naylun TM, Moe KT. 2013. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of atrial fibrosis and development of an arrhythmogenic substrate. *Circ J* 77:1171–1179.
- Long CS. 2001. The role of interleukin-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev* 6:81–94.
- Louault C, Benamer N, Faivre JF, Potreau D, Bescond J. 2008. Implication of connexins 40 and 43 in functional coupling between mouse cardiac fibroblasts in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 1778:2097–2104.
- MacKenzie D, Summerour SR, Villarreal FJ. 2000. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 46:257–263.
- Manabe I, Shindo T, Nagai R. 2002. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: Involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91:1103–1113.
- Manso AM, Kang SM, Ross RS. 2009. Integrins, focal adhesions, and cardiac fibroblasts. *J Invest Med* 57:856–860.
- Martin P. 1997. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75–81.
- Mayer DC, Leinwand LA. 1997. Sarcomeric gene expression and contractility in myofibroblasts. *J Cell Biol* 139:1477–1484.
- McArthur L, Chilton L, Smith GL, Nicklin SA. 2015. Electrical consequences of cardiac myocytes: Fibroblast coupling. *Biochem Soc Trans* 43:513–518.
- Messier RH, Jr, Bass BL, Aly HM, Jones JL, Domkowski PW, Wallace RB, Hopkins RA. 1994. Dual structural and functional phenotypes of the porcine aortic valve interstitial population: Characteristics of the leaflet myofibroblast. *J Surg Res* 57:1–21.
- Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. 2007. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res* 101:755–758.
- Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. 2007. IL-1 beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1139–1147.
- Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. 2014. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: The road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol* 70:83–91.
- Olvey HE, Mundell NA, Austin AF, Barnett JV. 2006. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* 235:50–59.
- Olson ER, Nuzzle JE, Zhang X, Bomer JA, Meszaros JG. 2005. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1131–1138.
- Pedersen SF, Nilius B. 2007. Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation. *Methods Enzymol* 428:183–207.
- Porter KE, Turner NA. 2009. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123:255–278.
- Poulet C, Kunzel S, Buttner E, Lindner D, Westermann D, Ravens U. 2016. Altered physiological functions and ion currents in atrial fibroblasts from patients with chronic atrial fibrillation. *Physiol Rep* 4:e12681.
- Putko BN, Wang Z, Lo J, Anderson T, Becher H, Dyck JR, Kassiri Z, Oudit GY, Alberta HL. 2014. Circulating levels of tumor necrosis factor-alpha receptor 2 are increased in heart failure with preserved ejection fraction relative to heart failure with reduced ejection fraction: Evidence for a divergence in pathophysiology. *PLoS ONE* 9:e99495.
- Qi XY, Huang H, Ordog B, Luo X, Naud P, Sun Y, Wu CT, Dawson K, Tadevosyan A, Chen Y, Harada M, Dobrev D, Nattel S. 2015. Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circ Res* 116:836–845.
- Raizman JE, Komljenovic J, Chang R, Deng C, Bedosky KM, Rattan SG, Cunningham RH, Freed DH, Dixon IM. 2007. The participation of the Na<sup>+</sup>–Ca<sup>2+</sup> exchanger in primary cardiac myofibroblast migration, contraction, and proliferation. *J Cell Physiol* 213:540–551.
- Ruwhof C, van Wamel AE, Egas JM, van der Laarse A. 2000. Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 208:89–98.
- Singhi S, Kumar R, Smith M, Baker KM, Dostal DE. 2005. Activation of protein kinase A by atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiac fibroblasts: Role in regulation of the local renin-angiotensin system. *Regul Pept* 132:1–8.
- Schwartz MA, DeSimone DW. 2008. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol* 20:551–556.
- Serini G, Gabbiani G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250:273–283.
- Shibukawa Y, Chilton L, Macconnell KA, Clark RB, Giles WR. 2005. K<sup>+</sup> currents activated by depolarization in cardiac fibroblasts. *Biophys J* 88:3924–3935.
- Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. 2009. Cardiac fibroblasts: The renaissance cell. *Circ Res* 105:1164–1176.
- Stawowy P, Margeta C, Blaschke F, Lindschau C, Spencer-Hansch C, Leitges M, Biagini G, Fleck E, Graf K. 2005. Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 67:50–59.
- Turner NA, Aley PK, Hall KT, Warburton P, Galisowsky S, Migley L, O'Regan DJ, Wood IC, Ball SG, Porter KE. 2007a. Simvastatin inhibits TNFalpha-induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms. *J Mole Cell Cardiol* 43:168–176.
- Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. 2007b. Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 76:81–90.
- Turner NA, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. 2011. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1450–1458.
- Valiente-Alandi I, Schafer AE, Blaxall BC. 2016. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 91:228–237.
- van Nieuwenhoven FA, Hemming KE, Porter KE, Turner NA. 2013. Combined effects of interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta1 on modulation of human cardiac fibroblast function. *Matrix Biol* 32:399–406.
- van Nieuwenhoven FA, Turner NA. 2013. The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. *Vascul Pharmacol* 58:182–188.
- Vasquez C, Benamer N, Morley GE. 2011. The cardiac fibroblast: Functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 57:380–388.
- Wang LP, Wang Y, Zhao LM, Li GR, Deng XL. 2013. Angiotensin II upregulates K(Ca)<sub>v</sub>3.1 channels and stimulates cell proliferation in rat cardiac fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 85:1486–1494.
- Weber KT. 2004. Fibrosis in hypertensive heart disease: Focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 22:47–50.
- Wells RG, Discher DE. 2008. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF-beta: The insoluble and soluble meet. *Sci Signal* 1:pe13.
- Wynn TA. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199–210.
- Xu J, Cui G, Esmaïlian F, Plunkett M, Marelli D, Ardeshal A, Odini J, Laks H, Sen L. 2004. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 109:363–368.
- Zeisberg M, Kalluri R. 2013. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. I. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C216–225.
- Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamoto T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kuroki S, Takeda H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukumizu A, Umemura S, Iriti T, Fujita T, Komuro I. 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6:499–506.