



HAL
open science

Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques : caractérisation d'échantillons végétaux sur des modèles cellulaires impliqués dans l'obésité

Mehdi Frifra

► **To cite this version:**

Mehdi Frifra. Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques : caractérisation d'échantillons végétaux sur des modèles cellulaires impliqués dans l'obésité. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0084 . tel-03270761

HAL Id: tel-03270761

<https://theses.hal.science/tel-03270761>

Submitted on 25 Jun 2021

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

Mehdi FRIFRA

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé Nantes Angers

Discipline : Biologie Cellulaire
Spécialité : Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques
Unité de recherche : INSERM U1063 SOPAM

Soutenue le 23 Mai 2017
Thèse N° : 112462

Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques

Caractérisation d'échantillons végétaux sur des modèles cellulaires
impliqués dans l'obésité

JURY

Rapporteurs : **Bernard MULLER**, Professeur d'Université, Université de Bordeaux
Christine MORAND, Directeur de Recherche, Université d'Auvergne

Examineur : **Khadija OUGUERRAM**, Professeur d'Université, Université de Nantes

Directeurs de Thèse : **Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA**, Directeur de Recherche, Université d'Angers
Jean-Pierre RENOU, Directeur de Recherche, Agrocampus Ouest, Université d'Angers

**IMPACT DES NUTRIMENTS SUR LES MALADIES
MÉTABOLIQUES : CARACTÉRISATION
D'ÉCHANTILLONS VÉGÉTAUX SUR DES MODÈLES
CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS L'OBÉSITÉ**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques

Présenté et soutenu par

Mehdi FRIFRA

Le 23 Mai 2017

JURY

Rapporteurs :

Bernard MULLER, Professeur d'Université, Université de Bordeaux
Christine MORAND, Directeur de Recherche, Université d'Auvergne

Examineur :

Khadija OUGUERRAM, Professeur d'Université, Université de Nantes

Directeurs de Thèse :

Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA, Directeur de Recherche, Université
d'Angers
Jean-Pierre RENOU, Directeur de Recherche, Agrocampus Ouest, Université
d'Angers

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude au Dr. Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA, directeur du laboratoire INSERM U1063 SOPAM, pour m'avoir donné le privilège de travailler à ses côtés. Monsieur je suis honoré que vous m'ayez sélectionné pour faire partie du projet INUMAMET. Notre collaboration, certes émaillée de quelques difficultés que nous avons su affrontées, m'a permis d'acquérir de nouvelles connaissances, d'apprendre le travail d'équipe ainsi que la rigueur scientifique nécessaire à la réalisation de ce travail de thèse . Cela restera pour moi une riche expérience dont je vous serai éternellement reconnaissant.

Je remercie également Dr. Jean-Pierre RENO, mon co-directeur de thèse. Vos connaissances en biologie végétale m'ont beaucoup apporté pour ce travail de thèse mais bien plus encore. Au cours de notre collaboration, j'ai appris à connaître un homme très décontracté, abordable malgré la position que vous avez au sein de l' Institut qu' est l'INRA.

Je remercie Carmen MARTINEZ, directrice adjointe du laboratoire. Carmen m'a permis de faire mes premiers pas dans le domaine de la recherche lors de mon stage de 1^{ère} année de Master. Vous aviez alors relu et corrigé mon rapport de stage. Vous m'avez également relu et aidé pour la rédaction de cette thèse. Ainsi, la boucle est bouclée ! Ce fût un plaisir d'avoir fait votre connaissance : vous êtes à la fois douée et gentille et je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir introduit dans le milieu de la recherche. Malgré tous les efforts, je m'excuse de ne pas avoir réussi à vous tutoyer.

Je remercie Raffaella SOLETI pour m'avoir encadré durant ce travail. Grâce à ta spontanéité et ta pédagogie j'ai pu m'améliorer dans les techniques nécessaires pour réaliser cette thèse. Je te remercie de m'avoir transmis ta démarche scientifique. Ta bonne humeur me manquera. Cependant je me permets, au travers de ces remerciements, de te dire que mon prénom s'épelle Mehdi et non Medhi !

Je remercie l'équipe « INUMAMET » composée de Catherine DOURGUIA, Grégory HILAIRET, Patricia MALLEGOL et Raffaella SOLETI. Ce fût un travail de longue haleine et je suis fier d'avoir été votre collègue. J'espère qu'il en a été de même pour vous malgré mon côté introverti !

Je remercie les équipes FruitQual et QuarVeg pour leur participation à ce travail et les réunions passées à vos côtés. Je remercie également toutes les personnes de « La Morinière » pour nous avoir fourni tous les végétaux nécessaires lors de nos expérimentations.

Je remercie les Professeurs Ludovic MARTIN, Georges LEFTHERIOTIS, Annick BARTHELAIX et le Docteur Sylvie CHEVALIER pour m'avoir accueilli lors de ma 2^{ème} année de Master. J'ai beaucoup appris à vos côtés pendant ces dix mois et J'espère que les travaux auxquels j'ai pu modestement participé ont permis d'avancer vos recherches sur le Pseudoxanthome Élastique.

Je remercie Dr. Emmanuel GARCION et Dr. Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN pour avoir évalué mon travail lors des comités de suivi de thèse. Je remercie également mes rapporteurs Dr. Christine MORAND, Pr. Bernard MULLER et Pr. Khadija OUGUERRAM pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie mes collègues Edward MILBANK et Sylvain RECOQUILLON pour toute l'aide professionnelle et le soutien personnel que vous m'avez apporté ainsi que pour toutes nos pause-café . Ces petits moments vont à coup sûr me manquer. Je remercie aussi Alexis pour avoir accepté mes Nanards.

Je remercie tous les membres passés et présents du laboratoire : Luisa (à partir de maintenant je ne pourrai plus te fournir en film ou séries !), Audrey (merci de m'avoir initié aux 3T3-L1), Eid, Ousama, Gaceb, Samuel, Catherine, Soazig, Jacques, Simon, Mireille, Manolo, Nadia, Marine, Maëva, Camille, Mathieu, Denis, Vanessa, Liliana, Zaïnab. Une des forces de ce laboratoire est qu'il est cosmopolite. J'ai appris à connaître des personnalités

aussi différentes qu'intéressantes. J'espère que vous avez apprécié autant que moi les moments que j'ai pu partager avec vous.

Je remercie Pascale Dupuis pour toute l'aide qu'elle a pu m'apporter lors de la lecture de ce manuscrit

Je remercie mes « frères » Charles, Ali et Denis B. De nous quatre, je suis le seul à avoir persisté dans le domaine scientifique. Je suis fier de vous connaître et j'espère que vous prendrez le temps de lire ce travail. Mon collègue Edward se retrouve également dans cette catégorie mais il a déjà eu ses remerciements.

Je remercie également mes amis Bud, Adrien, Ben, Greg, Maud, Clémence, Arthur pour les bons moments passés ensemble durant ces 3 années.

Je remercie mes tantes parisiennes Fatna, Fatiha et Jamila pour leurs gentillesse malgré leurs forts caractères. Je remercie mes cousins Nourdine et Mansour.

Je remercie particulièrement mon cousin Samy. Tu vas pouvoir, j'espère, comprendre ce que j'ai pu faire pendant ces 3 années.

Je remercie ma mère pour le soutien qu'elle a pu m'apporter depuis quasiment 30 ans ! Ta bonne humeur et ta mauvaise foi m'ont aidé durant ces trois années. J'en profite pour également remercier Denis D. pour le soutien logistique mais également pour ton tempérament calme et réfléchi. J'espère que vous comprendrez ce que je fais quand (et si !) vous lirez mon manuscrit.

Je remercie mes frères Léo et Marius. J'espère que ce travail me rendra plus sérieux à vos yeux. Je remercie également ma sœur Naïma.

Je remercie Pauline. Cela fait 5 années que tu me supportes. Tu as été d'un énorme soutien lors de ma thèse, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci.

Je remercie Farrokh BULSARA, Steven ELLISON, David Robert JONES, Kendrick LAMAR DUCKWORTH, Robert Nesta Marley, James MURPHY et Elie YAFFA pour le soutien musical.

Je remercie mon père. Sans toi, je ne serai pas là où j'en suis. Tu as toujours été là pour moi. Ce travail est aussi le tien.

Enfin, merci à Camélia.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----|
| TABLE DES MATIÈRES | 6 |
| ABBRÉVIATIONS | 10 |
| CONTEXTE | 13 |
| INTRODUCTION | 15 |
| I. L'obésité | 15 |
| A. Définition | 15 |
| B. Épidémiologie | 16 |
| C. Facteurs à l'origine de l'obésité | 17 |
| i. Obésité et génétique | 18 |
| ii. Obésité et mode de vie | 18 |
| iii. Obésité et facteurs environnementaux | 19 |
| D. Le tissu adipeux | 19 |
| i. L'adipogenèse | 21 |
| a. Phase de détermination | 20 |
| b. Phase de différenciation | 21 |
| 1. La famille des C/EBP | 21 |
| 2. PPAR γ | 22 |
| c. Étapes de différenciation | 22 |
| ii. Types de tissu adipeux | 24 |
| iii. Autres fonctions du tissu adipeux | 25 |
| a. Lipogenèse | 26 |
| b. Lipolyse | 27 |
| c. Fonction endocrine | 28 |
| 1. La leptine | 28 |
| 2. L'adiponectine | 31 |
| II. Obésité et désordres métaboliques associés à l'obésité | 36 |
| A. Dyslipidémie | 36 |
| B. Stéatose hépatique | 36 |
| C. Altérations des fonctions sécrétrices et processus inflammatoire | 37 |
| D. Stress oxydant | 38 |
| E. Diabète de type II | 39 |

| | | |
|------|---|----|
| F. | Cancer | 40 |
| G. | Pathologies cardiovasculaires | 41 |
| III. | L'athérosclérose | 42 |
| A. | Anatomie des artères | 42 |
| B. | Endothélium et perméabilité | 43 |
| C. | Endothélium et réactivité vasculaire | 44 |
| i. | Monoxyde d'azote | 44 |
| ii. | Prostacycline | 46 |
| iii. | Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium | 47 |
| iv. | Endothéline | 49 |
| v. | Thromboxane A ₂ | 49 |
| D. | Dysfonction endothéliale | 51 |
| i. | Dysfonction endothéliale et stress oxydant | 51 |
| ii. | Dysfonction endothéliale et inflammation | 53 |
| E. | Développement de l'athérosclérose | 54 |
| F. | Monoxyde d'azote et athérosclérose | 58 |
| IV. | Traitements de l'obésité | 60 |
| A. | Traitement périphérique | 60 |
| B. | Traitement central | 60 |
| C. | Chirurgie bariatrique | 61 |
| V. | Le projet INUMAMET | 63 |
| A. | Présentation des modèles d'études | 65 |
| i. | La pomme | 65 |
| a. | Pomme et économie | 66 |
| b. | Pomme et nutrition | 66 |
| 1. | Fibres | 66 |
| 2. | Polyphénols | 67 |
| ii. | La carotte | 71 |
| a. | Caroténoïdes | 72 |
| B. | Propriétés thérapeutiques des polyphénols et des caroténoïdes | 73 |
| i. | Effets des polyphénols et caroténoïdes sur le stress oxydant | 73 |

| | | |
|-----------------------------|--|-----------|
| ii. | Effets des polyphénols et caroténoïdes sur les pathologies métaboliques | 74 |
| iii. | Effets des polyphénols et caroténoïdes sur les pathologies cardiovasculaires | 75 |
| iv. | Effets de la consommation de pommes et carottes sur les pathologies associées à l'obésité | 76 |
| C. | La stratégie INUMAMET | 77 |
| OBJECTIFS | | 79 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | | 80 |
| I. | Réactifs et échantillons | 80 |
| II. | Culture cellulaire | 82 |
| III. | Détermination de la population apoptotique | 83 |
| IV. | Stress oxydant | 83 |
| V. | Coloration et quantification des gouttelettes lipidiques au Red Oil au niveau des hépatocytes (HepG2) et des adipocytes (3T3-L1) | 84 |
| VI. | Interprétation des résultats | 85 |
| RÉSULTATS | | 88 |
| I. | Effets des échantillons de pommes solubilisés dans le DMSO et l'EtOH | 88 |
| A. | Stress Oxydant au niveau des adipocytes | 88 |
| B. | Différenciation et accumulation des lipides au niveau des adipocytes | 88 |
| C. | Stress oxydant au niveau des hépatocytes | 90 |
| D. | Accumulation des lipides au niveau des hépatocytes | 90 |
| E. | Apoptose au niveau des hépatocytes | 91 |
| II. | Effets des échantillons de carottes solubilisés dans le DMSO et l'EtOH | 93 |
| A. | Stress Oxydant au niveau des adipocytes | 93 |
| B. | Différenciation et accumulation des lipides au niveau des adipocytes | 93 |
| C. | Stress oxydant au niveau des hépatocytes | 95 |
| D. | Accumulation des lipides au niveau des hépatocytes | 95 |

| | |
|--|-----|
| ARTICLE : Apple extracts displays anti-apoptotic effects on endothelial cells by stimulating reactive oxygen species | 103 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 123 |
| I. Discussion de notre étude | 123 |
| II. Perspective de l'étude | 130 |
| RÉFÉRENCES | 132 |

ABBREVIATIONS

ABCG : ATP-Binding Cassette sub family G
AC : Atmosphère Contrôlée
ACC : Acetyl-CoA Carboxylase
AdipoR2 : Adiponectin Receptor 2
aFABP : Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : AMP-activated Protein Kinase
aP2 : Adipocyte Protein 2
ATP : Adénosine TriPhosphate
BO : Bolero
BV : Blanche des Vosges
C : Condition de culture Contrôle
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding protein
CREB : C-AMP Element Binding protein
CRP-1 : C-Reactive Protein 1
DP : Deep Purple
EDHF : Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EGCG : Epigallocatechin Gallate
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD : Flavin Adenine Dinucleotide
FAS : Fatty Acid Synthase
FFA : Free Fatty Acid
FMN : Flavin MonoNucleotide
FN : Froid Normalisé
FoxO1 : Forkhead Box Protein 01
GxP : Glucose-x-Phosphate
GA : Gala
GD : Golden Delicious
GLUT : Glucose Transporter

GMP : Guanosine MonoPhosphate
GS : Granny Smith
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
HC : Haute Concentration (High Concentration)
HR : Condition de culture Post-Récolte
HIF-1 α : Hypoxia Inductible Factor 1 α
HSL : Hormone-Sensitive Lipase
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
IL-6 : Interleukine 6
JNK : c-Jun N-Terminal Kinase
KA : Karotan
KI : Kintoki
LC : Faible Concentration (Low Concentration)
LDL : Low Density Lipoprotein
LPL : LipoProtein Lipase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
NEFA : Non Esterified Fatty Acids
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFR2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NO : Monoxyde d'Azote (Nitric Oxide)
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PKA : Protein Kinase A
PL : Variété de carotte Pink Lady
PPAR : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor
PR : Variété de carotte Presto
RBP-4 : Retinol Binding Protein 4
ROS : Radicaux Libres Oxygénés (Radical Oxygen Species)
RXR : Retinoid-X-Receptor
SB : Stress Biotique
SC : Stress Croisés

SH : Stress Hydrique

SHNA : Stéatose Hépatique Non-Alcoolique

TG : TriGlycérides

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

UDP : Uridine DiPhosphate

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

XO : X-Ultra Low Oxygen

CONTEXTE

Les perturbations métaboliques constituent l'une des principales caractéristiques de nombreuses pathologies (syndrome métabolique, obésité, diabète) conduisant au développement de l'athérosclérose, première cause de mortalité dans les pays occidentaux mais aussi de plus en plus dans les pays en voie de développement et ceux du tiers monde. Nous devons faire face à une véritable pandémie. La fréquence de ces perturbations métaboliques représente aujourd'hui un véritable coût financier pour nos sociétés. En effet, ces perturbations sont à l'origine de 40 % des frais médicaux et d'hospitalisation en France obligeant à mettre en place de politiques de prévention diverses. Parmi elles, l'approche nutritionnelle représente une des voies essentielles de prévention des troubles métaboliques. Or, si de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence la relation inverse entre la consommation de certains aliments comme les fruits et légumes et les maladies cardiovasculaires grâce à des composés issus de ces aliments (e.g. les polyphénols), aucune ne permettait d'identifier l'impact métabolique des nutriments ainsi que leurs cibles cellulaires. De même, la variabilité de la qualité nutritionnelle engendrée par la diversité génétique des plantes sources de ces aliments ou par les conditions de production ou de conservation semble rarement prise en compte dans la mesure de cet impact.

Le projet INUMAMET (Impact des NUtriments sur les MALadies METaboliques) dans lequel s'inscrit ce projet de thèse vise à l'identification et l'optimisation de l'impact des nutriments contre les pathologies métaboliques et cardiovasculaires. Ce projet, portant sur la transversalité et la mise en réseau des compétences des pôles Santé (INSERM) et végétal (IRHS), propose d'aborder l'impact de la variabilité végétale sur l'organisme humain afin de guider les productions des végétaux vers une composition optimale de nutriments bénéfiques dans la lutte contre l'obésité.

Ainsi, en nous appuyant sur l'expertise régionale des Pays-de-la-Loire, nous avons établi un modèle de recherche à partir de composés issus de la carotte et de la pomme. La carotte est un « aliment santé » par excellence du fait de sa richesse en antioxydants (caroténoïdes, polyphénols) et en fibres. La pomme est un pourvoyeur de fibres, glucides, acides organiques, polyphénols et minéraux. Des travaux épidémiologiques suggèrent que leur consommation participerait à la prévention de certains cancers, de maladies

cardiovasculaires, du diabète ou encore de la dégénérescence maculaire. Ce modèle permettra de répondre à la question suivante : existe-t-il une interaction à la fois environnementale et génétique agissant au niveau des végétaux et quelle en est la conséquence sur des modèles cellulaires impliqués dans l'obésité.

Avant d'exposer ce travail de recherche il est important de préciser ce qu'est l'obésité et d'identifier les désordres métaboliques qui y sont associés. Il s'agira également de comprendre la physiopathologie de l'athérome et les méthodes de traitement de l'obésité actuelles.

INTRODUCTION

I. L'obésité

A. Définition

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité se définit comme une accumulation anormale ou excessive de masse graisseuse et représente alors un risque pour la santé. L'obésité, autrefois associée aux pays occidentaux, s'étend aujourd'hui aux pays en voie de développement et à ceux du Tiers-Monde, devenant ainsi une pandémie.

L'obésité est déterminée en fonction de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) (ou BMI pour Body-Mass Index en anglais). Cet indice, calculé selon la formule $\text{masse}/\text{taille}^2$ (kg/m^2), permet de classer les individus en différentes catégories de poids et alors d'évaluer le surpoids ou l'obésité d'une personne. Cette classification a été établie par l'OMS afin de pouvoir établir de manière rapide la corpulence d'un individu.

Tableau 1) Classification de la morphologie humaine en fonction de l'IMC

| Indice de Masse Corporelle (IMC) kg/m^2 | Classification selon l'OMS |
|---|----------------------------|
| $x < 16,5$ | Famine |
| $16,5 < x < 18,4$ | Maigreur |
| $18,5 < x < 24,9$ | Corpulence normale |
| $25 < x < 29,9$ | Surpoids, Pré-obésité |
| $30 < x < 34,9$ | Obésité modérée |
| $35 < x < 39,9$ | Obésité sévère |
| $x > 40$ | Obésité morbide |

Cependant, ce calcul ne prend pas en compte la composition du corps humain. En effet, un athlète de haut niveau peut avoir un IMC élevé à cause de sa masse musculaire et non de sa masse grasseuse. Le seul calcul de l'IMC ne permet donc pas à lui seul de définir l'obésité.

B. Épidémiologie

Le surpoids et l'obésité sont en constante augmentation dans le monde, et ce, depuis des décennies. Le Pr. Majid EZZATI a réalisé une étude visant à évaluer l'obésité au niveau mondial en étudiant plus de 19 millions de participants répartis dans 186 pays. Les premiers résultats de cette étude ont montré que l'IMC est passé de 21,7 en 1975 à 24,2 en 2014 chez les hommes et de 22,1 à 24,4 chez les femmes. Les pays anglophones sont (les pays) les plus concernés par ce phénomène avec une moyenne d'augmentation de l'IMC de 1 par décennie. Parallèlement, le nombre de personnes en sous-poids (IMC < 18,5) a diminué durant ce même laps de temps.

En terme de population, le pourcentage de personnes obèses est passé de 3,2% à 10,8% en 40 ans. Cela représente plus de 640 millions de personnes dans le monde répartis comme suit : 266 millions d'hommes et de 375 millions de femmes. À titre de comparaison, ils étaient respectivement 34 et 71 millions en 1974. Si cette tendance se poursuit, l'étude prévoit qu'1 personne sur 5 dans le monde sera obèse (18% des hommes et 21% des femmes) d'ici 2025.

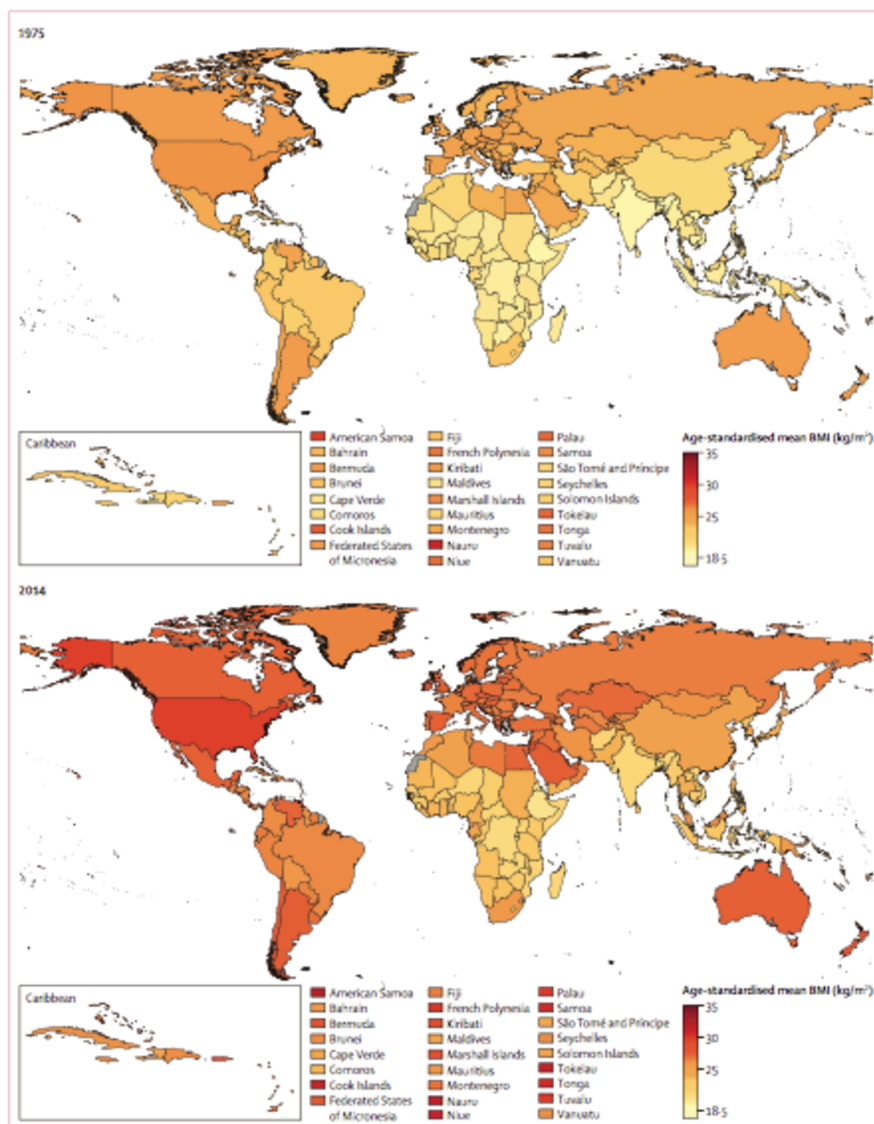


Figure 1) Moyenne de BMI par pays en 1975 (Haut) et 2014 (Bas)

Au niveau national, le rapport de l'ObEpi ROCHE datant de 2012 dévoile que le pourcentage de la population obèse adulte atteint 15% et augmente jusqu' à 32% pour la population adulte en surpoids.

C. Facteurs à l'origine de l'obésité

La principale cause de l'obésité est le dérèglement de la balance énergétique avec des apports supérieurs aux dépenses. Les apports énergétiques proviennent de la nourriture ingérée par l'organisme tandis que les dépenses se définissent comme la

somme des dépenses physiques et des dépenses métaboliques. Le métabolisme de base constitue la dépense énergétique minimale nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme et correspond à 60% des dépenses énergétiques totales journalières.

i. Obésité et génétique

Une étude réalisée par l'équipe de Bouchard (Bouchard *et al.*, 1990) a mis en évidence des prises de poids différentes sur des patients soumis au même régime alimentaire pendant 3 mois. Ainsi, certaines personnes sembleraient génétiquement protégées contre l'obésité, tandis que d'autres y seraient plus exposées. D'ailleurs, dès 1962, James Neel émettait une hypothèse connue sous le nom de *Thrifty Gene Hypothesis* laissant penser que, suite à des périodes de famine et de jeûne successives, l'organisme humain a sélectionné et conservé les gènes impliqués dans le stockage de l'énergie (Neel, 1962).

Depuis cette étude, le développement de nouvelles technologies a permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, près de 200 gènes ont été identifiés et leurs mutations seraient responsables du développement de l'obésité. D'ailleurs, 70% des patients obèses ont au moins un parent dans la même situation. Cependant, ce pourcentage doit être nuancé car, en plus de partager leurs informations génétiques, ces personnes ont le plus souvent le même mode de vie et les mêmes habitudes alimentaires (Rankinen & Bouchard, 2006).

ii. Obésité et Mode de vie

L'évolution des modes de vie a été notamment marquée par une population de plus en plus sédentaire avec des habitudes alimentaires modifiées.

En effet, aujourd'hui, la population bénéficie certes d'une plus grande disponibilité alimentaire mais elle a aussi adopté des habitudes alimentaires malsaines avec l'explosion de la « mal-bouffe » symbolisée par les fast-food, les boissons sucrées consommées en grande quantité, les aliments riches en sel, en additifs... autant d'éléments facteurs de prise de poids et donc de risque d'obésité.

Parallèlement, nos sociétés ont vu se développer des métiers et activités plus sédentaires et d'ailleurs une étude de Egger *et al.* (Egger *et al.*, 2001) a démontré qu'il y a 150 ans les populations dépensaient quasiment 3 fois plus d'énergie dans leurs activités quotidiennes. Cette étude peut être corrélée à celle de Brownson *et al.* (Brownson *et al.*, 2005) qui a montré que la population américaine passe environ 8h par jour devant la télévision, ce qui est deux fois plus important qu'il y a 50 ans.

iii. Obésité et facteurs environnementaux

Il semblerait que des facteurs environnementaux jouent également un rôle prépondérant dans le développement de l'obésité. Parmi eux on peut incriminer le stress, le manque de sommeil, l'exposition à des polluants, des virus, la consommation de certains médicaments, certaines addictions, les troubles psychiques...

En raison de l'augmentation du nombre de personnes obèses, l'espérance de vie va pour la première fois diminuer aux États-Unis, et « l'American Heart Association » vient d'ailleurs de reclasser l'obésité comme «facteur de risque modifiable majeur» des pathologies coronariennes. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le lien entre les maladies métaboliques et les maladies cardiovasculaires, impliquant l'effet de la prise de poids sur les facteurs de risque conventionnels, mais aussi sur des facteurs moins classiques. Cet aspect est lié à l'activité endocrine et paracrine du tissu adipeux, producteur de cytokines et autres médiateurs. Si ces molécules bioactives influencent l'homéostasie de la masse corporelle, elles affectent également la résistance à l'insuline, le diabète, l'homéostasie lipidique, la pression artérielle, la coagulation, la fibrinolyse, l'inflammation, la fonction cardiaque et l'athérosclérose (Van Gaal *et al.*, 2006).

D. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est composé en grande majorité d'adipocytes ainsi qu'une fraction stroma-vasculaire contenant des cellules endothéliales et des macrophages (Ouchi *et*

al., 2011) (Figure 2). Ces adipocytes sont composés d'une importante vacuole lipidique qui représente environ 90% de la taille totale de la cellule et leur noyau se retrouve au niveau périphérique.

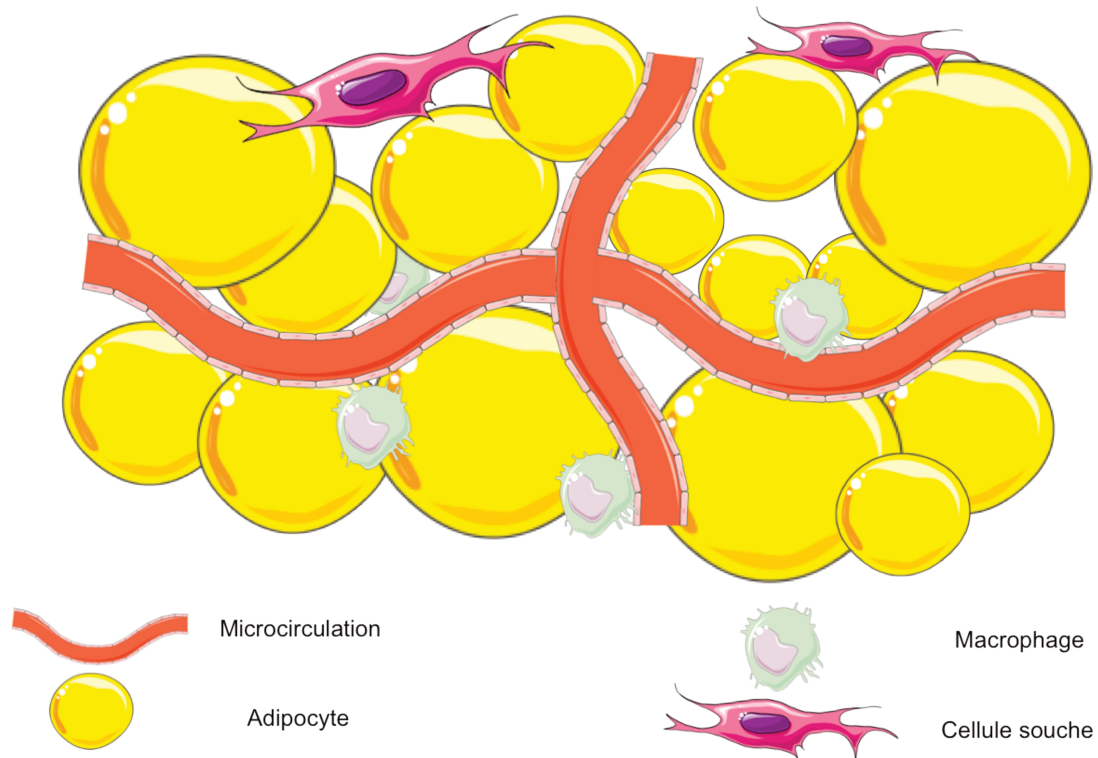


Figure 2) Représentation schématique du tissu adipeux

Ces adipocytes se trouvent en nombre très important au sein de l'organisme (20 milliards de cellules). Les adipocytes apparaissent suite à un processus de différenciation de cellules de phénotype fibroblastique appelées pré-adipocytes et possèdent plusieurs fonctions (Rosen *et al.*, 2006). Le tissu adipeux apparaît pendant la grossesse. Cependant, l'adipogénèse, ou le stock d'adipocytes, débute peu après la naissance du nouveau-né et se répartit en 2 phases (Figure 3).

i. L'adipogenèse

a. Phase de détermination

Cette phase implique un changement phénotypique. Les cellules souches mésenchymateuses sont ainsi converties dans un 1^{er} temps en adipoblastes, puis différenciés en pré-adipocytes. Ces pré-adipocytes vont ensuite entrer en phase d'expansion clonale. L'arrêt du cycle cellulaire des pré-adipocytes induit un changement phénotypique, favorisant ainsi la conversion des pré-adipocytes en adipocytes matures (Rosen *et al.*, 2006).

Les adipoblastes, qui sont de phénotype fibroblastique, entrent en phase de croissance exponentielle. Suite à cette croissance, les adipoblastes se différencient en pré-adipocytes via la voie de signalisation Wnt (Chu *et al.*, 2017). Ce processus induit l'expression à la surface des cellules des marqueurs précoces de la différenciation adipocytaire, tels que la chaîne $\alpha 2$ du collagène. La chaîne $\alpha 2$ permet un remodelage du cytosquelette et de la matrice extracellulaire nécessaire à la différenciation adipocytaire.

Cette étape d'expansion clonale est primordiale pour la différenciation. En effet, lors de cette expansion clonale, des facteurs pro-adipogéniques sont exprimés au niveau de ces cellules, tels que la famille des C/EBP et le récepteur PPAR γ (Feng *et al.*, 2016). Ces facteurs de transcription permettront aux cellules de s'engager dans la voie de différenciation adipocytaire et ainsi changer de phénotype.

b. Phase de différenciation

1. La famille des C/EBP

Les protéines C/EBP sont des facteurs de transcription. Il existe six isoformes de ces facteurs de transcription, allant de C/EBP- α à C/EBP- ζ . Des études ont notamment démontré que l'expression ectopique de l'isoforme C/EBP- β accélérerait la différenciation des fibroblastes 3T3-L1 en adipocytes (Ali *et al.*, 2013). À l'inverse, la déplétion de cette isoforme inhibe la différenciation des fibroblastes embryonnaires. Les tests *in vivo* ont également démontré que les isoformes C/EBP- β et C/EBP- δ chez

la souris induit un phénotype non viable. Environ 85% des souris décèdent en période périnatale, soulignant le rôle-clé de ces facteurs de transcription dans le développement embryonnaire (Ali *et al.*, 2013).

Ces facteurs de transcription se caractérisent par la présence d'un domaine leucine-zipper au niveau du C-Terminal. Ce domaine permet notamment la dimérisation entre les différentes protéines C/EBP (homodomérisation ou hétérodimérisation) (Ramji & Foka., 2002). Le dimère néo-formé va ensuite se fixer au niveau de la région promotrice de gènes adipogéniques, le plus important étant le gène codant pour le récepteur PPAR γ (Siersbæk *et al.*, 2010).

2. PPAR γ

Le récepteur PPAR γ est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce récepteur est le régulateur-clé de l'adipogenèse. Le récepteur PPAR γ forme avec le récepteur de l'acide rétinoïque RXR un hétérodimère pouvant reconnaître au sein des régions promotrices des gènes cibles les éléments de réponses PPRE (Tontonoz & Spiegelman., 2008). La surexpression du récepteur PPAR γ *in vitro* favorise la différenciation des adipocytes ainsi que la formation de gouttelettes lipidiques et ce, en activant des gènes pro-adipogéniques. Au contraire, la délétion *in vivo* du gène codant pour ce récepteur provoque la mort de souris durant le développement embryonnaire, démontrant ainsi le rôle-clé de PPAR γ (Tontonoz & Spiegelman, 2008).

c. Étapes de la différenciation

La protéine CREB phosphorylée stimule l'expression du facteur de transcription C/EBP- β . Ensuite, durant la phase d'expansion clonale, les kinases MAPK et GSK3 β vont hyperphosphoryler C/EBP- β , permettant la dimérisation de cette protéine avec C/EBP- δ (Aouadi *et al.*, 2007). Ce dimère se fixe au niveau de la région promotrice du récepteur PPAR γ et de C/EBP- α , permettant ainsi leurs expressions. Ces protéines vont initier un feedback positif, permettant une auto-induction de l'expression de

ces protéines. Deux jours après le début de la phase de différenciation, la protéine C/EBP- α s'accumule et favorise ainsi l'inhibition du cycle cellulaire. Cette inhibition permet aux cellules de débiter la phase finale de la différenciation. Le récepteur PPAR γ va ainsi pouvoir activer les gènes des facteurs impliqués dans l'adipogénèse (aP2, GLUT-4 ou bien la Lipoprotéine Lipase) (Tontonoz & Spiegelman., 2008). (Figure 3)

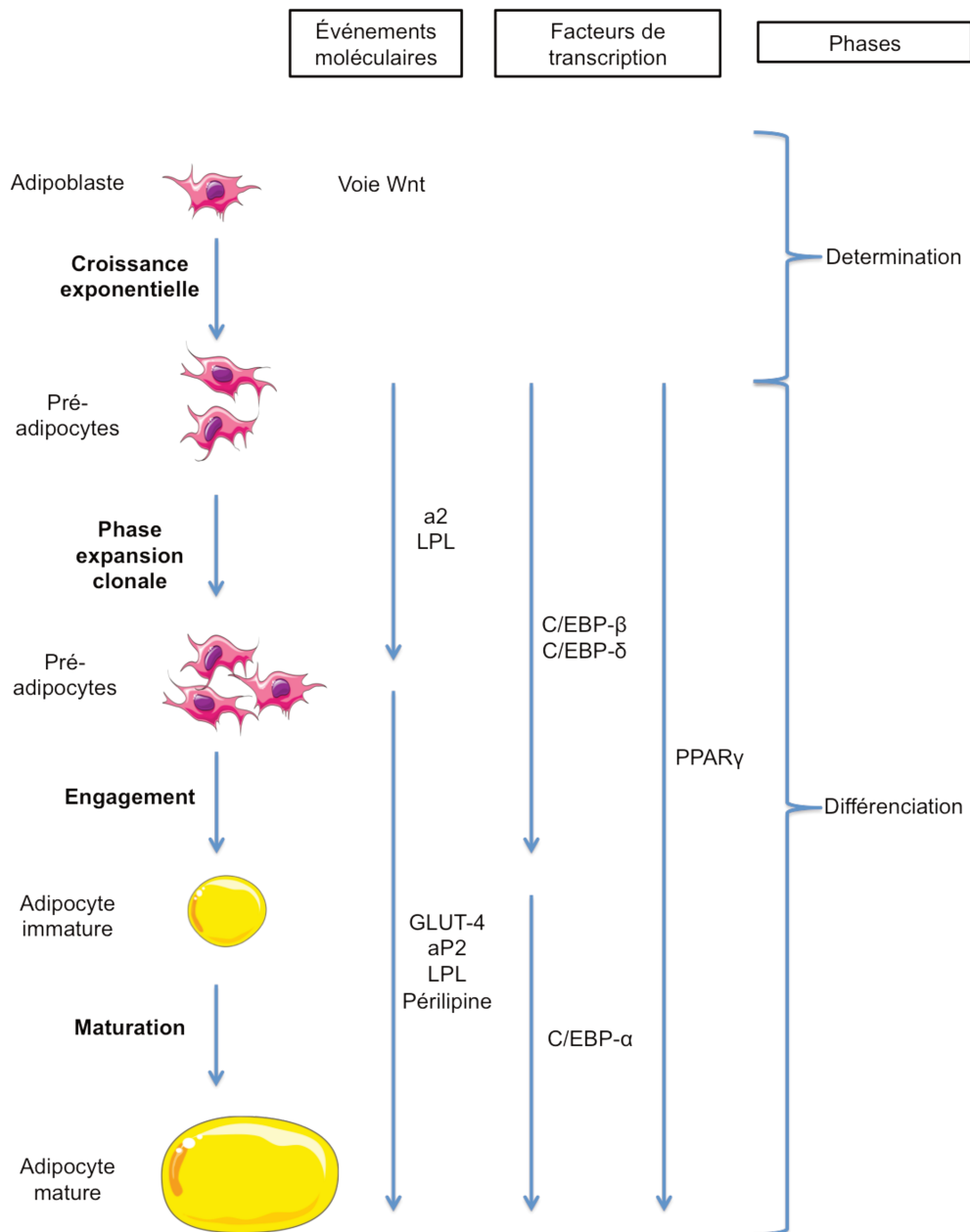


Figure 3) Étapes de la différenciation adipocytaire

ii. Types de tissus adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif dont la principale fonction est de stocker les lipides. Ce tissu représente, chez les sujets sains, un pourcentage du poids total plus important chez la femme (20-25%) que chez l'homme (15-20%). Chez les personnes obèses, ce pourcentage peut atteindre jusqu'à 50%. Chez les mammifères il existe deux types de tissu adipeux :

- le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est composé d'adipocytes multiloculaires (cytoplasme composé entre autres de nombreuses vacuoles lipidiques) avec un noyau central. Ce tissu se retrouve en majorité chez les mammifères hibernants ainsi que chez les nouveaux-nés. Chez l'adulte, le tissu adipeux brun est localisé au niveau de la région interscapulaire.

Son rôle est d'assurer la production de chaleur *via* le processus de thermogénèse sans frisson (Cannon *et al.*, 2004). En effet, les adipocytes bruns contiennent un nombre important de mitochondries permettant la production de chaleur grâce à la protéine UCP-1 (Uncoupled Protein-1). La chaleur ainsi produite sera transmise dans le sang grâce au réseau vasculaire du tissu adipeux brun très développé.

- le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est connu comme étant la réserve énergétique la plus importante du corps humain. Ce tissu se développe lors de 3 périodes dites « sensibles » : lors du dernier mois de grossesse, chez le nouveau-né (jusqu'à ses 2 ans) et lors de la pré-adolescence (Otto *et al.*, 2005). Durant ces périodes, une réserve d'adipocytes se forme afin de pouvoir stocker les lipides.

En fonction du lieu de stockage des adipocytes, on parle de tissu adipeux sous-cutané ou viscéral et chacun à une fonction précise.

- Le tissu adipeux sous-cutané

Le rôle principal du tissu adipeux sous-cutané est de stocker les lipides. De ce fait, il est le tissu prioritairement touché par l'obésité mais aussi lors de la perte de poids (Ibrahim, 2010). Il est situé sous l'hypoderme. Sa quantité dépend à la fois du sexe et de la zone anatomique (Samsell *et al.*, 2014).

Ainsi, pour l'homme, le tissu adipeux sous-cutané se localise plutôt au niveau de l'abdomen et de la partie haute du corps au niveau des épaules. Les hommes obèses souffrent d'obésité androïde et physiquement, cela se traduit par une obésité en forme de « pomme ». Ce phénotype se retrouve principalement associé aux maladies cardiovasculaires.

Chez la femme, le tissu adipeux sous-cutané est localisé au niveau des hanches et des cuisses. Dans le cas d'obésité chez les femmes, on parle de profil gynoïde, se caractérisant par une morphologie en « poire ».

- Le tissu adipeux viscéral

Contrairement au tissu adipeux sous-cutané, la principale fonction du tissu adipeux viscéral est endocrinienne. En effet, il présente une concentration plus importante des facteurs impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline. Le tissu adipeux viscéral possède donc un rôle métabolique plus important que le tissu adipeux sous-cutané (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007) et représente entre 5 et 20 % du volume total de tissu adipeux.

iii. Autres fonctions du tissu adipeux

La fonction principale du tissu adipeux est donc le stockage des lipides mais il possède aussi d'autres fonctions métaboliques.

a. La lipogenèse

La lipogenèse est un processus physiologique permettant la production et le stockage d'acides gras. On distingue deux types de synthèse des lipides : la synthèse des triglycérides provenant de l'alimentation et la lipogenèse *de novo* via l'acétyl-CoA à partir du glucose.

Les acides gras nécessaires à la formation de triglycérides proviennent de la circulation. La première source de triglycérides est l'alimentation. Ces derniers sont dans un premier temps digérés par les sels biliaires, ce qui conduira à la libération d'acides gras et de monoglycérides sous forme de micelles. Les acides gras et les monoglycérides sont alors absorbés dans l'intestin grâce à l'hétérodimère ABGC5/ABCG8. Ces transporteurs, issus de la superfamille des ATP-Binding Cassette, sont impliqués dans l'absorption intestinale et l'excrétion de la bile nécessaire à la digestion lipidique (Rudkowska & Jones, 2008). Ensuite, les monoglycérides sont associés avec les acides gras transformés en acyl-CoA via l'acyl-CoA Synthase afin de produire de nouveaux triglycérides. Ces derniers sont enveloppés par des protéines issues de la membrane du réticulum endoplasmique granuleux afin de former les chylomicrons. Ces derniers permettent le transport des lipides de l'intestin vers le tissu adipeux.

La seconde source de triglycérides se trouve au niveau du foie. En effet, le foie, également lieu de synthèse d'acides gras, produit des triglycérides en associant 2 acides gras avec du glycérol. Ces triglycérides sont ensuite largués dans la circulation sous la forme de VLDL. Les triglycérides ainsi formés sont hydrolysés par l'intermédiaire de la Lipoprotéine Lipase (LPL). Cette enzyme, synthétisée par les adipocytes, permet l'ancrage des triglycérides au niveau des cellules endothéliales du tissu adipeux. Les triglycérides sont ensuite hydrolysés et les acides gras diffusent dans les adipocytes par diffusion simple ou bien grâce à différentes protéines de transport telles que CD36 ou la Fatty Acid Translocase Protein (Lafontan, 2008).

La lipogenèse peut également se produire à partir du glucose. Ce phénomène est connu sous le nom de lipogenèse *de novo*. Ce mécanisme est contrôlé et régulé par

l'insuline car elle permet l'entrée du glucose dans les adipocytes. La lipogenèse s'effectue intégralement au niveau du cytosol (Ameer *et al.*, 2014). Tout d'abord, l'insuline se fixe au niveau de son récepteur pour permettre l'entrée du glucose dans la cellule via la transcription et l'expression du gène du récepteur au glucose GLUT-4. Le pyruvate issu de la glycolyse est ensuite converti en un précurseur de la synthèse des acides gras : l'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA sera enfin converti en triglycérides via la synthèse d'acides gras (Fatty Acid Synthase) puis stocké dans les adipocytes au niveau des gouttelettes lipidiques (Ameer *et al.*, 2014).

Les triglycérides stockés dans les adipocytes représentent la principale réserve énergétique de l'organisme. Ces réserves peuvent être utilisées lorsque l'organisme est en hypoglycémie suite à un jeûne par exemple (Ameer *et al.*, 2014). Les triglycérides contenus dans les adipocytes sont alors convertis en glycérols qui seront eux-mêmes convertis en glucides par le phénomène de lipolyse.

b. La lipolyse

La lipolyse est un processus permettant la dégradation des lipides. Elle résulte de la libération du glycérol et des acides gras non estérifiés. Cette réaction physiologique se produit lorsque l'organisme subit un stress énergétique, notamment lors d'un effort physique. Le mécanisme le plus connu est dépendant de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC).

La lipolyse est stimulée par une hormone hyperglycémiant sécrétée par le pancréas appelée glucagon. Cette hormone se fixe sur son récepteur et augmente l'activité de l'adénylate cyclase. Cette action est couplée à l'activité des récepteurs β -adrénergiques (Lass *et al.*, 2011). L'adénylate cyclase catalyse l'ATP afin d'obtenir de l'AMPC. Cet AMPC active la PKA qui à son tour va activer l'hormone-sensible lipase (HSL). Une fois activé, la HSL va transloquer au niveau des vacuoles lipidiques et ainsi être absorbée par les périlipines (Duncan *et al.*, 2007). Dans des conditions physiologiques, la fonction principale de ces périlipines est d'inhiber la lipolyse. La translocation de la HSL vers les vacuoles induit la phosphorylation des périlipines par la PKA, ce qui aura pour conséquence la levée de l'inhibition de la lipolyse, favorisant

ainsi l'hydrolyse des triglycérides (Zechner *et al.*, 2012). Les acides gras sont ensuite captés par les Adipose Fatty-Acid Binding Protein (aFABP), permettant leur séquestration (Lafontan & Langin., 2009).

c. Fonction endocrine

Le tissu adipeux, en plus de son rôle de stockage, est également un organe sécréteur. En effet, les adipocytes ont la capacité de sécréter diverses hormones. Ces hormones sont notamment impliquées dans la prise alimentaire et contrôlent la balance énergétique en impactant différentes cellules cibles telles que les hépatocytes ou bien les cellules constituant les vaisseaux. Les deux hormones majeures sécrétées par les adipocytes sont la leptine et l'adiponectine.

1. La leptine

La leptine est une hormone régulant la satiété. Elle a été découverte suite aux clonages des souris *ob/ob*. La sécrétion de cette hormone est proportionnelle à la masse grasse de l'individu et régulée selon différents facteurs. L'excès de gras ou l'insulinémie élevée favorise la sécrétion de leptine tandis que le jeûne ou le faible stockage d'énergie sous forme d'acides gras inhibe sa sécrétion. La concentration de cette hormone est plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané (Margetic *et al.*, 2002).

Cette hormone se fixe au niveau de son récepteur ObRb situé au niveau des noyaux hypothalamiques. Cet événement induit la phosphorylation de la kinase Jak2 et du récepteur. Cette phosphorylation se réalise sur plusieurs résidus tyrosine : la Tyr₉₈₅, la Tyr₁₀₇₇ et la Tyr₁₁₃₈.

La phosphorylation Tyr₉₈₅ permet d'activer ERK au travers du recrutement de la protéine SHP2 (connu également sous le nom de PTPN11 pour Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11). La délétion de cette protéine dans un modèle *in vivo* induit une augmentation de l'obésité chez la souris, démontrant ainsi le rôle

important de SHP2 dans les effets anti-obésité de la leptine (Pérez-Pérez *et al.*, 2017).

La phosphorylation Tyr₁₀₇₇ conduit à la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 par Jak2. Le facteur de transcription STAT5, lorsqu'il est déplété dans le modèle murin, favorise l'augmentation de la prise alimentaire. Ces résultats démontrent ainsi l'implication de la voie Jak2/STAT5 dans la prise alimentaire (Zhou & Rui, 2013).

Enfin, la phosphorylation de la Tyr₁₁₃₈ active STAT3. Cette phosphorylation induit une homodimerisation de STAT3. Les modèles de souris KO pour STAT3 induit une hyperphagie et une obésité importantes comparées aux souris contrôle. Le dimère STAT3 favorise également l'expression de la cytokine SOCS3. Cette cytokine permet notamment d'inhiber par un système de feedback négatif les voies de signalisation induites par la leptine (Lee *et al.*, 2008).

Les voies de signalisation Jak2/STAT3, Jak2/STAT5 et SHP2/Erk induisent l'inhibition de l'expression de peptides oréxigéniques tels que l'Agouti-related peptide (Villanueva & Myers, 2008) et l'augmentation de l'expression de gènes anorexigéniques (Kelesedis *et al.*, 2010). (Figure 4)

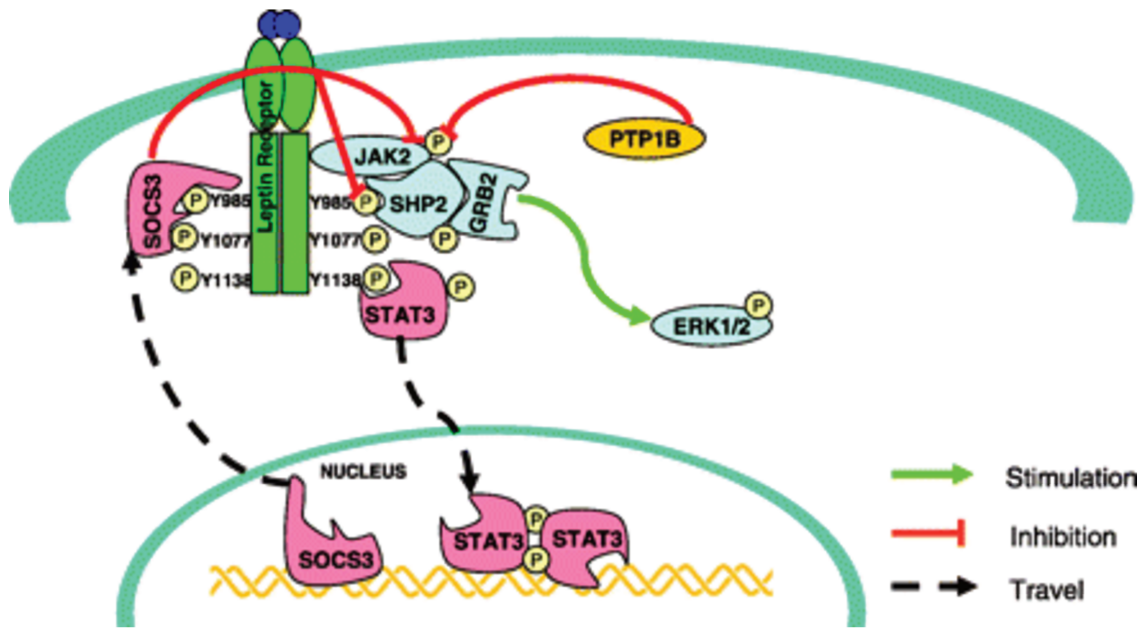


Figure 4) Voie de signalisation de la leptine (Yang & Barouch, 2008)

La fixation de la leptine sur le récepteur ObRb induit la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine : la Tyr₉₈₅, la Tyr₁₀₇₇ et la Tyr₁₁₃₈. Ces phosphorylations vont activer les voies de signalisation SHP2/Erk, Jak2/STAT5 et Jak2/STAT3, respectivement, ce qui aura pour conséquence l'activation et l'inhibition de gènes anorexigéniques et orexigéniques. Ces voies de signalisation sont inhibées par la cytokine SOCS3 par un système de feedback négatif.

Des études *in vivo* ont aussi démontré l'implication de la leptine dans la régulation de la glycémie. Toyoshima *et al* (Toyoshima *et al.*, 2005) ont développé un modèle de souris surexprimant un dominant négatif du récepteur à l'insuline au niveau des muscles squelettiques. Ce modèle n'affecte pas la production basale de leptine mais permet de déterminer si le traitement de ces souris déficientes à la leptine serait efficace pour corriger les effets de la résistance à l'insuline. Les résultats ont démontré que la leptine avait la capacité de corriger l'hyperglycémie, notamment en favorisant l'expression du récepteur GLUT-4 au niveau des muscles squelettiques. Cette même étude a également démontré que la leptine augmentait la sensibilité à l'insuline des adipocytes pour ce modèle de souris.

Enfin la leptine intervient dans le métabolisme des lipides. Des études *in vitro* ont démontré la diminution de l'expression des enzymes responsables de la lipogenèse, à savoir la FAS et la ACC. La leptine favorise également la lipolyse, en stimulant l'oxydation des acides gras. (Harris, 2014).

2. L'adiponectine

L'adiponectine est une hormone impliquée dans le métabolisme des glucides et des lipides. Il en existe 3 formes d'adiponectine. Sa production d'adiponectine est régulée par l'insuline qui inhibe l'activité de la protéine FoxO1. La protéine FoxO1 inhibe l'activité du récepteur PPAR γ . Des études ont notamment démontré l'importance de ce récepteur dans la régulation de cette hormone. En effet, la mutation du gène codant pour le récepteur PPAR γ diminue de manière importante la production d'adiponectine dans un modèle murin (He *et al.*, 2003). Des cytokines pro-inflammatoires peuvent également réguler de manière négative la production d'adiponectine. (Shehzad *et al.*, 2012). (Figure 5)

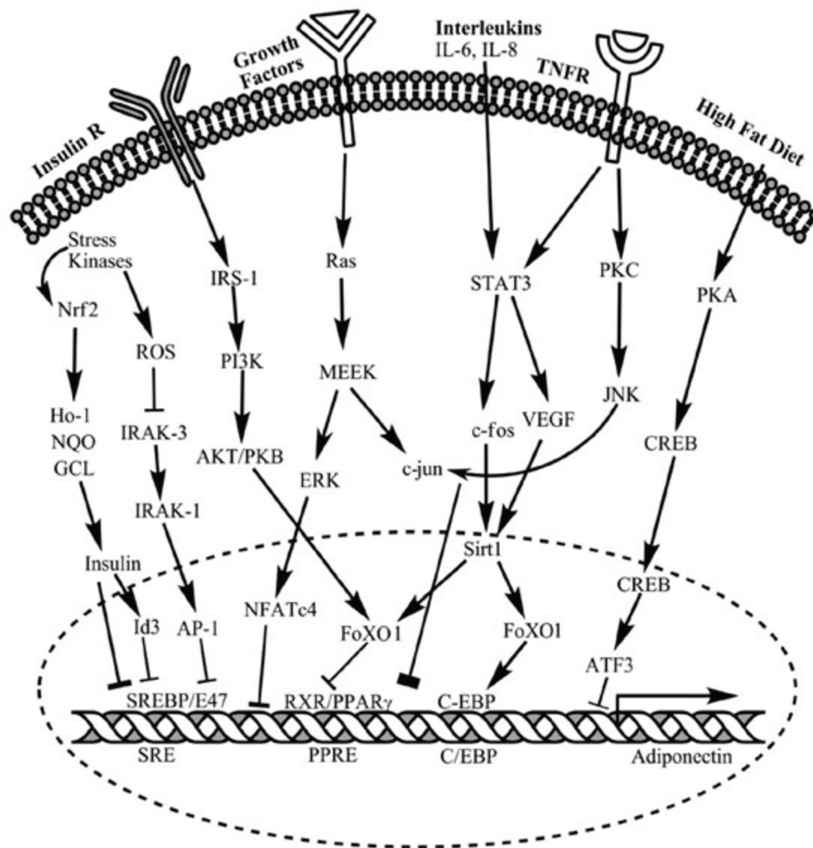


Figure 5) Régulation de l'adiponectine (Shehzad *et al.*, 2012).

Les radicaux libres interviennent dans la régulation de l'adiponectine. En effet, les ROS inhibent l'activité de IRAK-3, ce qui aura pour conséquence l'activation de la protéine AP-1. Cette dernière inhibe la transcription de l'adiponectine.

Des cytokines proinflammatoires telles que IL-6 ou IL-8 activent la voie de signalisation STAT-3, ce qui aura pour conséquence l'inhibition de la production d'adiponectine.

À l'inverse, l'insuline, au travers de l'activation de la voie PI3-K, permet l'inhibition du répresseur FoxO1, ce qui aura pour conséquence la levée du blocage de l'activité du récepteur PPAR γ . L'activité restaurée de ce récepteur permet ainsi d'activer la transcription de l'adiponectine.

Une fois produite et sécrétée, l'adiponectine se fixe sur 3 récepteurs différents (Yamauchi & Kadowaki., 2008) :

- AdipoR1 : Ce récepteur est ubiquitaire. Cependant, il se retrouve en quantité plus importante au niveau des muscles squelettiques. L'adiponectine, suite à sa fixation sur ce récepteur, active l'AMPK, ce qui potentialise l'effet de l'insuline. Cette voie de signalisation permet l'inactivation de l'ACC, induisant une diminution de manolyl-CoA. La concentration diminuée de manolyl Co-A engendre une baisse de son action inhibitrice sur la Carnitine Palmitoyltransférase-1 (CPT-1). Cette protéine pourra donc intervenir sur l'oxydation des acides gras suite à la levée de son inhibition. Ce phénomène permet une meilleure captation du glucose au niveau des muscles squelettiques ainsi que la diminution de la gluconéogenèse au niveau du foie et la diminution de la lipotoxicité.
- AdipoR2 est majoritairement exprimé au niveau du foie. L'adiponectine favorise la bêta-oxydation des acides gras au niveau du foie suite à l'activation de la voie de PPAR α . Au niveau du foie, l'adiponectine diminue également la production de la protéine réactive C, qui participe au processus pro-inflammatoire.
- T-cadhérine est exprimée au niveau des cellules musculaires lisses et endothéliales. La fixation de l'adiponectine au niveau de ces récepteurs diminue la captation des LDL-cholestérol et l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α ou NF- κ B.

La fixation de l'adiponectine sur les récepteurs AdipoR1 et R2 permet l'activation de la voie AMPK. Cette voie de signalisation est notamment impliquée sur différents processus physiologiques telles que l'oxydation des acides gras. (Figure 6)

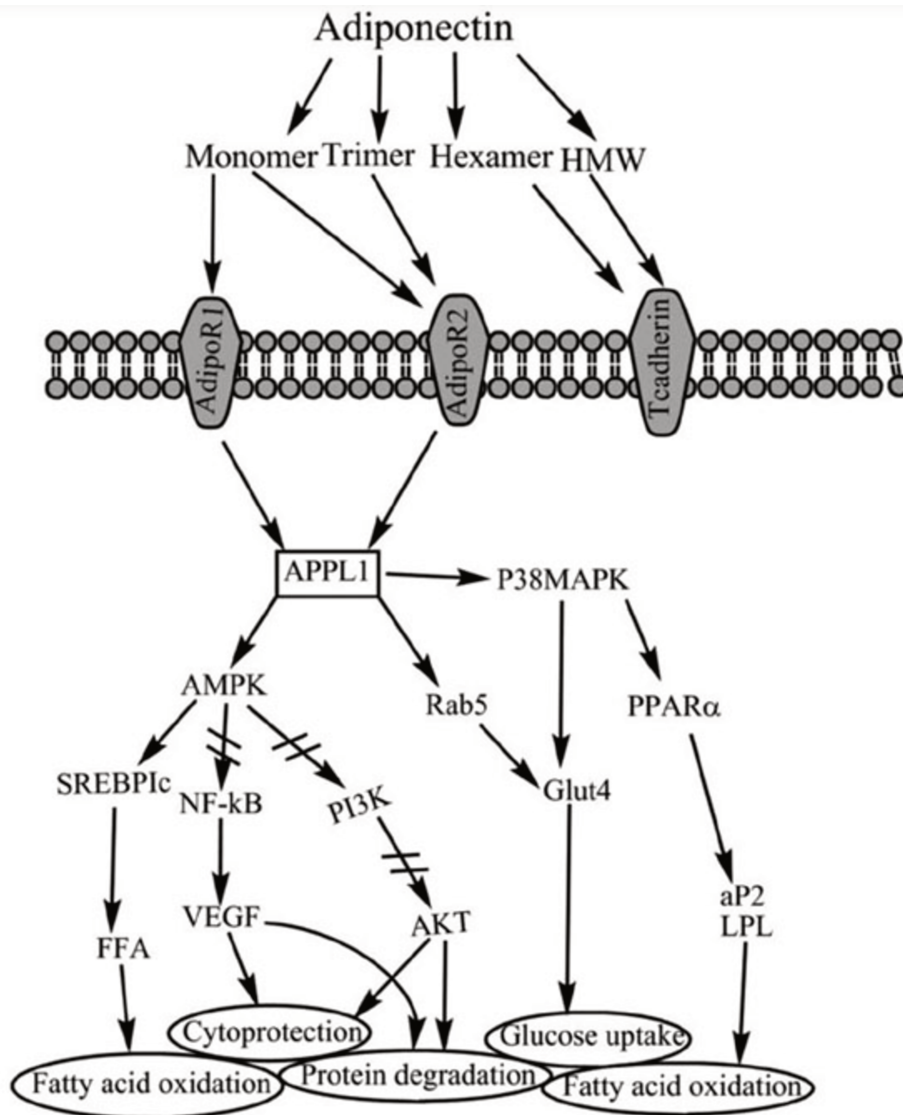


Figure 6) Action de l'adiponectine (Shehzad *et al.*, 2012)

Les récepteurs à l'adiponectine agissent sur la protéine APPL1 qui va par la suite activer la voie de l'AMPK. Cette voie intervient dans différents processus :

- L'AMPK permet l'oxydation des acides gras *via* l'activation de la protéine SREBP1c qui elle-même activera l'enzyme FAS responsable de la libération des acides gras.
- L'AMPK active la voie PI-3 / Akt, permettant ainsi la dégradation cellulaire observée notamment au niveau des vaisseaux de patients atteints de diabète.

L'adiponectine régule également l'oxydation des acides gras par l'intermédiaire de la voie P38/MAPK. Cette voie de signalisation permet l'activation des récepteurs PPAR γ qui aboutira à l'oxydation des acides.

Pour résumer, le tissu adipeux n'est pas seulement le lieu de stockage des lipides dans le corps humain puisqu'il a aussi une activité sécrétoire. Ainsi, les adipokines sécrétées par le tissu adipeux sont impliqués dans plusieurs mécanismes, tels que le métabolisme des glucides et des lipides. L'obésité induit le dérèglement de ces mécanismes, mais favorise ainsi le développement de nombreux désordres métaboliques.

II. Obésité et pathologies métaboliques associées

A. La dyslipidémie

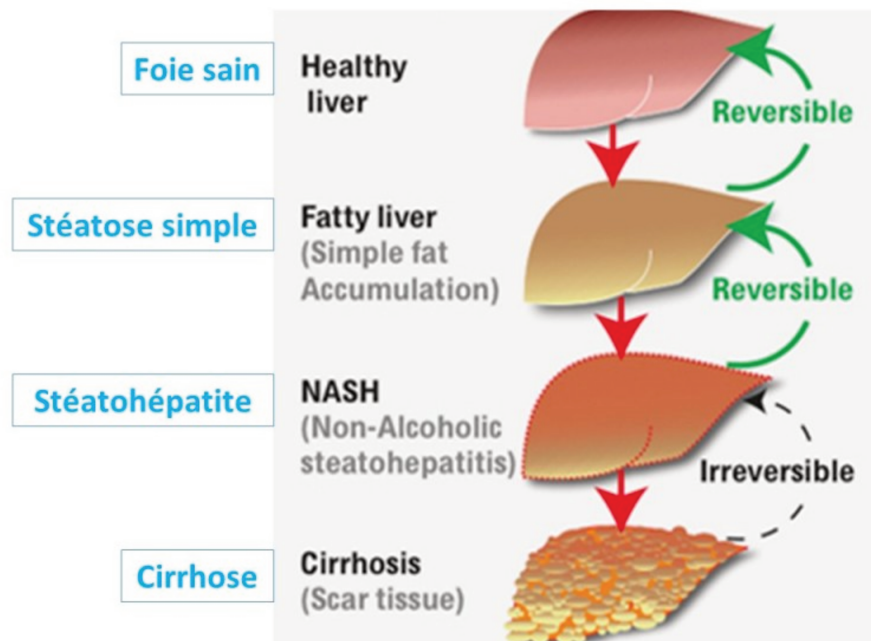
L'obésité est induite par une accumulation anormale de lipides au sein de l'organisme. Cette pathologie se traduit au niveau des adipocytes par :

- Une hypertrophie : augmentation de la taille des adipocytes
- Une hyperplasie : augmentation du nombre d'adipocytes

L'hypertrophie se retrouve au niveau des personnes en surpoids. D'un point de vue moléculaire, l'hypertrophie favorise l'augmentation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B, induisant également une augmentation de la réponse au TNF- α . L'incapacité des adipocytes à stocker les lipides favorise l'augmentation de la concentration en lipides au niveau du sérum, ou dyslipidémie. Cette dernière favorise elle-même la production d'un dépôt ectopique altérant les fonctions des différents organes touchés comme par exemple la stéatose hépatique (Helkin *et al.*, 2016)

B. La stéatose hépatique

Chez les patients atteints d'obésité, le tissu adipeux saturé en lipides provoque une stéatose hépatique. On parle de stéatose hépatique lorsque le dépôt ectopique représente entre 5 et 10% du volume du foie. Environ 60 et 75% de la population obèse est concernée par cette pathologie métabolique parfois bénigne mais pouvant aussi provoquer des lésions plus graves du foie. En effet, la stéatose hépatique peut évoluer vers une stéato-hépatite non alcoolique (SHNA) puis l'augmentation de l'inflammation, couplée à l'apoptose des hépatocytes induite par excès d'acides gras libres, peut conduire à une fibrose hépatique. Des tissus cicatriciels se forment en lieu et place des cellules hépatiques détruites. Lorsque la fibrose s'étend, elle peut être à l'origine d'une cirrhose (Wree *et al.*, 2013) (Rinella, 2015). (Figure 7)



(idem pour cette figure en annexe !)

Figure 7) Évolution de la stéatose hépatique (Gauthier, 2012)

Le dépôt ectopique de lipides au niveau du foie est défini comme une stéatose hépatique. Ce dépôt reste asymptomatique. Cependant, si ce dépôt persiste, une inflammation apparaît et la stéatose hépatique évolue en stéato-hépatite non alcoolique. Ces deux étapes, lorsqu'elles sont traitées à temps peuvent se reverser afin de revenir dans les conditions physiologiques. Mais si l'évolution continue, des dépôts cicatriciels apparaissent, favorisant le développement d'une cirrhose.

Enfin, dans un contexte d'obésité, le foie étant le lieu de synthèse des lipoprotéines de basse densité ou LDL-cholestérol participe au développement de l'athérosclérose. En effet, les LDL oxydés, couplés à la production de la protéine réactive C, concourent à la formation de l'athérosclérose qui est la pathologie des vaisseaux de gros calibres la plus répandue (Buchler *et al.*, 2011).

C. L'altération des fonctions sécrétrices et du tissu adipeux et le processus inflammatoire

La fonction sécrétrice du tissu adipeux est altérée chez les sujets obèses. L'augmentation de taille et le nombre d'adipocytes sont corrélés à l'expression et la sécrétion des adipokines, mais également à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Des études ont notamment démontré que l'hypertrophie favorisait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 ou et TNF- α (Skurk *et al.*, 2007). Des études *in vivo*, réalisées dans un modèle murin *ob/ob*, ont démontré que la déficience du gène codant pour le TNF- α restaurait la sensibilité à l'insuline. Le TNF- α , fixé sur son récepteur, va activer les voies de signalisation de la MAPK/ERK1/JNK/P38 et NF- κ B. Ces voies de signalisation vont induire un stress du réticulum endoplasmique, une augmentation de la lipolyse et un dérèglement de la production d'adiponectine (Cawthorn & Sethi, 2008). L'hypertrophie peut provoquer une hypoxie et induire la libération de HIF-1 α , favorisant alors la formation de radicaux libres (Sun *et al.*, 2011).

La sécrétion de la leptine est également affectée puisque sa concentration se retrouve décuplée chez les sujets obèses. Tout comme pour la résistance à l'insuline, la résistance à la leptine provient d'un défaut de réponse suite à la fixation de la leptine sur son récepteur. De ce fait, la leptine n'a plus la capacité d'activer les gènes anorexigéniques, ce qui provoque l'augmentation de la prise alimentaire chez les sujets obèses (Ren, 2004). Le gène codant pour la leptine peut également être muté chez certains patients. Cette forme mutée de la leptine ne peut plus se fixer sur son récepteur, ce qui a les mêmes conséquences que pour la résistance à la leptine (Kelesidis *et al.*, 2010) (Zhou & Rui, 2013).

D. Stress oxydant

Le tissu adipeux des patients obèses est soumis aux effets de l'augmentation du stress oxydant. L'équipe de Furukawa a découvert, chez un modèle murin atteint d'obésité, une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est

localisée uniquement au niveau des adipocytes *via* une augmentation de l'expression de l'ARNm de la NADPH Oxydase et une inhibition de la production d'enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase. En parallèle, la production d'enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase est diminuée. Cette augmentation du stress oxydant altère la production des adipokines. La diminution de la production d'adiponectine associée à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α), induit une résistance à l'insuline au niveau des adipocytes. Ce stress oxydant peut avoir des répercussions néfastes sur différents organes et donc participer au développement de pathologies liées à l'obésité.

Le tissu adipeux des patients obèses est soumis à une importante consommation d'oxygène à l'origine de la formation de radicaux libres dérivés de la chaîne mitochondriale, et de la perte d'électrons de la chaîne de transport d'électrons.

E. Diabète de type II

L'obésité est souvent associée à la résistance à l'insuline. Ce phénomène se définit par un défaut de l'insuline à agir sur ses cellules-cibles. Les cellules ne répondent plus aux concentrations basales de l'insuline, induisant ainsi un défaut de sensibilité couplée à une hyperinsulinémie (Jung & Choi, 2014).

Ce désordre métabolique se divise en plusieurs étapes :

- 1) Augmentation de la sécrétion d'insuline
- 2) Phase d'adaptation : elle correspond à l'apparition d'une hyperglycémie liée à l'incapacité des cellules bêta de compenser l'insulinorésistance
- 3) Phase de décompensation : une glycototoxicité apparaît
- 4) Faible sécrétion d'insuline permettant de limiter une acidocétose
- 5) Phase de décompensation sévère : l'acidocétose apparaît et nécessite un apport exogène d'insuline.

Ce dysfonctionnement se traduit par une diminution de la phosphorylation du récepteur à l'insuline par la cytokine TNF- α , ce qui aura pour conséquence une

diminution de l'activité de la PI3K (Jung & Choi, 2014). Chez l'homme, la phosphorylation au niveau du résidu Ser₃₁₂ chez l'homme diminue la translocation du récepteur au glucose GLUT-4 et donc le transport du glucose dans les cellules-cibles. La diminution de la captation du glucose induit alors une augmentation de la glycémie. Au niveau des adipocytes, la résistance à l'insuline provoque la dérégulation de la lipolyse et la libération d'acides gras libres (Gustafson *et al.*, 2015). Les sujets atteints de résistance à l'insuline sont soumis aussi à une activité lipolytique anormalement élevée par rapport aux sujets sains. La diminution du taux d'adiponectine favorise le relargage des acides gras non estérifiés dans la circulation ce qui, couplé à la saturation des lipides dans le tissu adipeux, induit une accumulation ectopique d'acides gras dans plusieurs organes et viscères. Cette accumulation d'acides gras favorise le développement de la stéatose (Van Gaal *et al.*, 2007).

F. Cancer

L'obésité peut être à l'origine de différents types de cancers. En effet, selon l'OMS, environ un tiers des cancers du colon, du sein ou de l'œsophage sont associés à l'obésité. D'ailleurs, en 2004, une étude réalisée par l'équipe de Danaei a démontré qu'environ 30% des décès dus au cancer sont liés à différents désordres métaboliques tels que l'obésité.

La résistance à l'insuline peut aussi être un des facteurs responsables du développement du cancer. En effet, la résistance à l'insuline induit une hyperinsulinémie propice à la croissance tumorale. De plus, des études *in vivo* réalisées dans un modèle murin ont démontré le potentiel de l'hyperinsulinémie à induire la métastase au niveau des poumons dans le cas du cancer du sein (Ferguson *et al.*, 2013).

G. Pathologies Cardiovasculaires

Les vaisseaux sanguins sont une cible privilégiée des pathologies associées à l'obésité. En effet, les processus oxydant et inflammatoire favorisent le développement de l'athérosclérose et donc des maladies cardiovasculaires. D'ailleurs l'association obésité / athérosclérose est principalement observée avant l'âge de 50 ans, ce qui signifie que l'obésité est responsable du développement d'un athérome précoce.

III. L'athérosclérose

Selon l'OMS, l'athérosclérose se définit comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre constitué d'une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media. Cette pathologie est responsable de plus de 10 millions de décès chaque année, ce qui en fait la 1^{ère} cause de mortalité au monde.

A. Anatomie des artères

Les artères sont composées de couches. La couche la plus externe se nomme adventice. Ce tissu conjonctif composé de fibres de collagène et d'élastine entoure l'artère et protège le vaisseau. La nutrition des parois vasculaires des artères de gros calibres est assurée par un système vasculaire appelé *vasa vasorum*. La seconde couche, séparée de l'adventice par la limitante élastique externe, est appelée media. Cette couche intermédiaire se compose de cellules musculaires lisses (CMLs). Cette couche intermédiaire permet, par la contraction et la relaxation des CMLs, la vasodilatation et la vasoconstriction.

Enfin, la couche la plus interne des artères constitue l'intima. Cette couche, séparée de la media par la limitante élastique interne, se trouve au contact direct de la lumière artérielle et donc de la circulation sanguine (Figure 8).

L'intima se compose d'une monocouche de cellules endothéliales ou endothélium qui représente plus de 300m² de surface d'échange avec le sang. L'endothélium est impliqué dans de nombreux processus vasculaires. En effet, il forme une barrière qui régule le passage de diverses molécules ou cellules immunitaires grâce à une perméabilité variable. L'endothélium permet aussi de réguler la pression artérielle en produisant des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs.

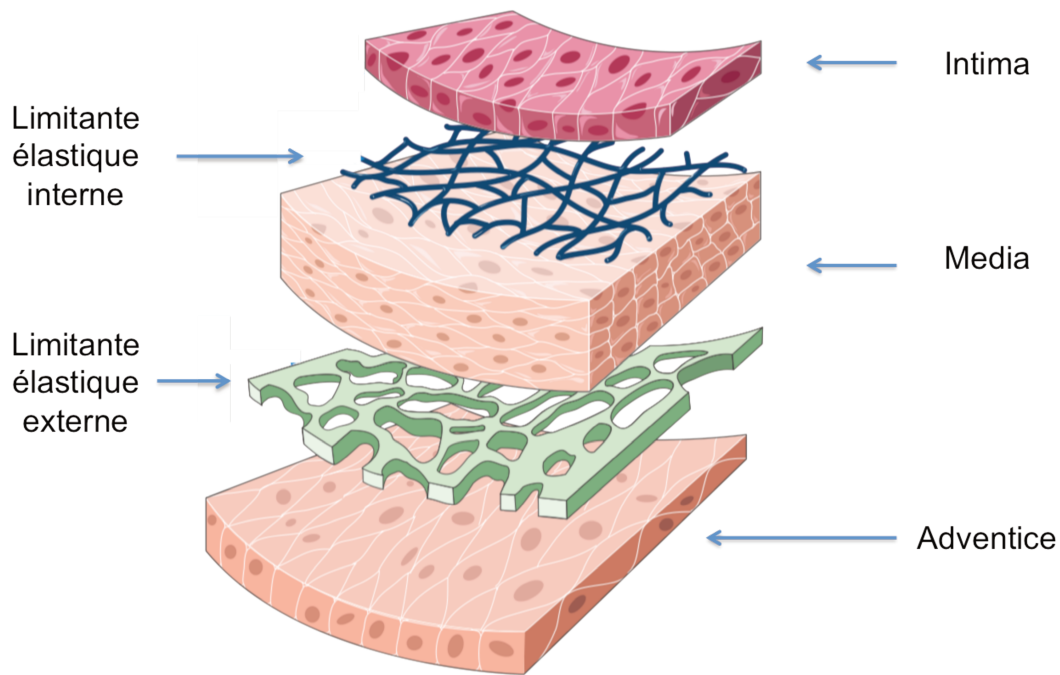


Figure 8) Anatomie des vaisseaux sanguins

B. Endothélium et perméabilité

L'endothélium est donc composé d'une monocouche de cellules endothéliales qui jouent le rôle de barrière à perméabilité sélective. Ainsi, par diffusion passive, il permet le passage des ions, gaz ou molécules à faible poids moléculaire. Cette perméabilité sélective n'est possible que grâce aux jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales. Il existe deux types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées et les jonctions adhérentes (Chistiakov *et al.*, 2015).

Les jonctions serrées impliquent trois protéines transmembranaires : les occludines, les claudines et les molécules d'adhérence jonctionnelle. Ces jonctions se retrouvent principalement au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Elles jouent un rôle primordial dans la polarité de la cellule en formant un pôle apical et un pôle basal, limitant ainsi la diffusion latérale des composés lipidiques et protéiques de la membrane plasmique. Ces jonctions sont également impliquées dans la prolifération cellulaire *via* l'inhibition du facteur de transcription ZONAB (ZO-1 Associated Nucleic Acid Binding) (Zinhi *et al.*, 2016).

Les jonctions adhérentes se retrouvent dans l'intégralité du système vasculaire. L'ouverture de ces jonctions permet à l'endothélium d'assurer sa fonction semi-perméable. Ces jonctions adhérentes sont formées par la VE-Cadhérine, ou cadhérines vasculaires endothéliales. Cette cadhérine, de 135 kDA, est composée de cinq modules extracellulaires, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytosolique. La VE-Cadhérine outre son rôle dans l'adhésion entre les cellules endothéliales, intervient dans différentes fonctions vitales au niveau des cellules endothéliales. Elle contrôle l'intégrité et la perméabilité vasculaire et, dans sa partie cytoplasmique, elle interagit avec les isoformes γ ou β de la caténine. Ces dernières s'associent alors avec l'isoforme α de la caténine pour permettre la stabilité de la monocouche endothéliale (Giannotta *et al.*, 2013).

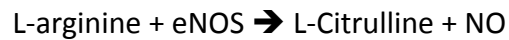
C. Endothélium et réactivité vasculaire

Les artères sont responsables de la régulation du flux sanguin grâce à leurs propriétés vasomotrices. La vasomotricité est la fonction permettant aux artères de modifier leurs diamètres, et de ce fait, de réguler la pression sanguine. Cette vasomotricité est régulée par la production par les cellules endothéliales de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs.

i. Monoxyde d'azote

Le NO est un gaz dont la biodisponibilité varie entre 6 et 30s. Cette molécule est principalement produite par les cellules endothéliales grâce à une enzyme : la eNOS, ou Nitric Oxide Synthase endothéliale. La production et l'expression de cette enzyme sont régulées par plusieurs facteurs. Les forces mécaniques telles que le cisaillement sanguin augmentent l'expression de cette enzyme. Des facteurs biochimiques peuvent également intervenir dans l'augmentation ou l'inhibition de la production de la eNOS. Les oestrogènes ou le VEGF favorisent l'expression de l'enzyme tandis que le TNF- α en diminue l'expression (Chamblis & Shaul, 2002) (Yan *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que le NO lui-même peut réguler l'expression de l'enzyme. En effet, diverses études ont démontré l'implication du NO dans la diminution de

l'expression de la eNOS *via* un feed-back négatif dépendant de la GMPc (Grumbach *et al.*, 2005). La synthèse du NO se fait selon la réaction suivante :



L'enzyme eNOS est constituée de deux domaines. Le premier domaine N-terminal oxygénase est constituée du co-facteur BH4 (Tetrahydrobioptérine), de la L-arginine et de sites de fixation de l'hème. Le second domaine, le domaine C-Terminal réductase, rassemble différents co-facteurs, à savoir la FAD (Flavine Adénine Dinucleotide), la FMN (Flavine mononucleotide) et la NADPH, mais aussi les sites de fixation de la calmoduline (Tousoulis *et al.*, 2012).

L'enzyme eNOS est soumise à différentes phosphorylations sur différents résidus, activatrices ou inhibitrices. La phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷ induit l'activation de l'enzyme. Cette phosphorylation fait suite à la force de cisaillement ou bien par les agents biochimiques cités précédemment. À l'inverse, la phosphorylation du résidu Thr⁴⁹⁵ inhibe l'activité de l'enzyme (Bauer & Sotníková, 2010).

La production du monoxyde d'azote intervient par l'activation de l'enzyme eNOS au niveau des cellules endothéliales. L'activité de l'eNOS est régulée selon plusieurs mécanismes tels que l'activation de la transcription du gène codant pour l'enzyme, le complexe calcium / calmoduline, ou bien des modifications post-traductionnelles. La séquestration de l'eNOS au niveau de la surface des cellules par la cavéoline-1 rend l'enzyme inactive. Le Ca²⁺ va interagir avec la calmoduline, permettant la levée de la séquestration et ainsi l'activation de la NOS endothéliale (eNOS) par déphosphorylation du site inhibiteur Thr⁴⁹⁵ ou par les forces de cisaillement. Le VEGF ou les oestrogènes peuvent également activer l'eNOS. Suite à leurs fixations sur leurs récepteurs réceptifs, le VEGF et les oestrogènes vont induire la phosphorylation de l'enzyme eNOS sur le résidu Ser¹¹⁷⁷ *via* la voie de signalisation Akt.

Après sa synthèse, le NO diffuse jusqu'au cellules musculaires lisses où il va interagir avec le noyau-hème de la guanylate cyclase (GC). Cette fixation NO-GC induit une augmentation de la production de la GMPc et l'activation de la protéine kinase G. Cette dernière va ainsi diminuer la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, permettant

une relaxation des cellules musculaires lisses et donc, une vasodilatation (Michel & Vanhoutte, 2010).

ii. Prostacycline

La prostacycline est une molécule de la famille des lipides sécrétée, entre autres, par les cellules endothéliales. Tout comme le NO, la formation de la prostacycline nécessite une augmentation du taux cytoplasmique de Ca^{2+} . La phospholipase A_2 (PLA_2) issu de la membrane du réticulum endoplasmique métabolise les phospholipides en acide arachidonique (AA). Une fois libéré, l'AA peut être pris en charge par différentes voies de signalisation : la voie des cyclo-oxygénases, la voies des lipoxygénases et la voie du cytochrome P450

En effet, cette augmentation du taux de Ca^{2+} active la phospholipase A_2 (PLA_2), permettant ainsi la formation d'acide arachidonique. (Mitchell *et al.*, 2008). L'acide arachidonique, par l'intermédiaire de l'enzyme cyclo-oxygénase, forme le précurseur de la prostacycline, la prostaglandine (PGG_2). Ce précurseur sera à l'origine de la formation de la prostaglandine H_2 par l'action de l'enzyme peroxydase (POX). Enfin, l'action de la prostaglandin I_2 Synthase permettra la formation de la prostacycline à partir de la prostaglandine H_2 (Stitham *et al.*, 2011). Cette molécule diffuse aussi au niveau des cellules musculaires lisses par l'intermédiaire des récepteurs à la prostacycline présents à la surface des cellules musculaires lisses. Cette fixation va activer l'adénylate cyclase qui elle même participera à la formation de l'AMPC. L'AMPC permet de diminuer le taux de Ca^{2+} et donc favoriser le relâchement des cellules musculaires lisses (Mitchell *et al.*, 2008). (Figure 9).

Le NO et la prostacycline sont étroitement liés. En effet, ces deux éléments nécessitent l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Des études ont également démontré que lorsque le NO diffuse dans les cellules musculaires lisses, celui-ci potentialise les effets de la prostacycline (Mitchell *et al.*, 2008). (Figure 9).

iii. Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) est une substance d'origine inconnue synthétisée par l'endothélium. Ce facteur permet la relaxation des vaisseaux et ce, indépendamment du monoxyde d'azote ou de la prostacycline. Des études ont observé une relaxation des artères lors d'expérimentations où étaient utilisés des inhibiteurs de la eNOS et de la prostacycline (Büssemaker *et al.*, 2003). L'EDHF induit une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} par l'intermédiaire des canaux potassiques sensibles au calcium (canaux K^+ Ca^{2+} -sensible). Des études utilisant un inhibiteur spécifique de ces canaux ont démontré une absence de relaxation, indiquant ainsi l'implication des canaux K^+ Ca^{2+} -sensible. L'EDHF induit donc une ouverture des canaux K^+ , ce qui aura pour conséquence une hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse. La sortie des ions K^+ favorise une diminution du Ca^{2+} cytoplasmique et donc une relaxation des vaisseaux (Féléto & Vanhoutte, 2009) (Figure 9).

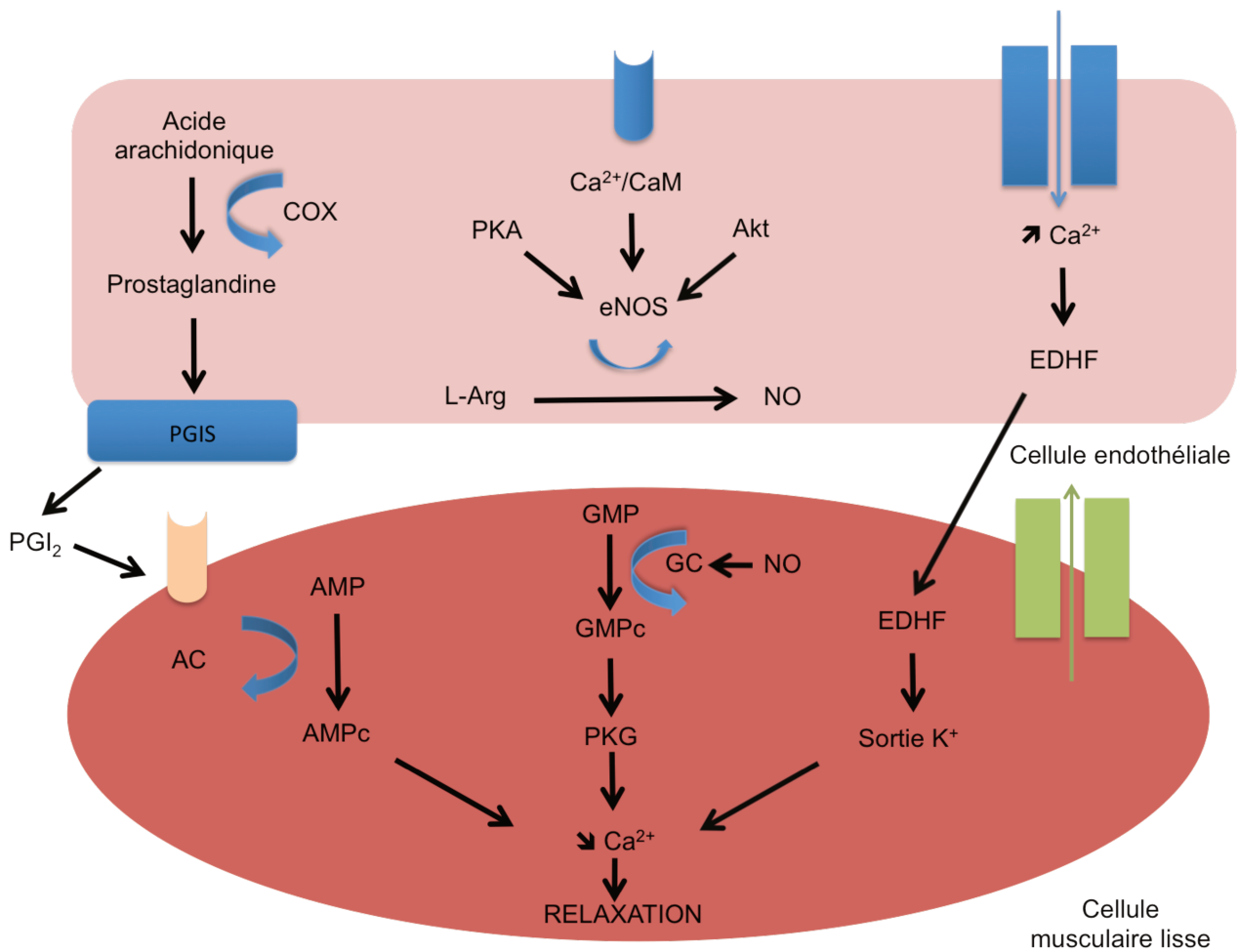


Figure 9) Mode d'action des facteurs vasorelaxants.

AC : Adénylate Cyclase ; Ca²⁺/CaM : Complexe calcium calmoduline ; COX : Cyclooxygénase ; GC : Guanylate Cyclase ; eNOS : synthase de NO endothéliale ; L-Arg : L-arginine ; PGIS : synthase de prostacycline ; PGI₂ : Prostacycline ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase G

iv. Endothéline

L'endothéline est un peptide sécrété par les cellules endothéliales. Sa fonction principale est de contracter les vaisseaux en se fixant sur les récepteurs présents à la surface des cellules musculaires lisses. Il existe 3 isoformes de cette protéine : ET-1, ET-2 et ET-3. Cependant, la forme la plus exprimée est l'isoforme ET-1. L'expression de l'ET-1 est favorisée suite à différents stimuli tels que la diminution du flux sanguin ou bien les cytokines pro-inflammatoires (Tykocki & Watts, 2010).

Dans un premier temps, l'ET est produite sous forme d'un précurseur inactif nommé préproendothéline. Ce dernier est par la suite clivé sous une autre forme inactive appelée Big-ET. Big-ET sera enfin clivé par des enzymes de conversion afin de donner la forme finale active de l'ET.

L'ET-1, lorsqu'elle est fixée à son récepteur situé sur les cellules musculaires lisses, induit l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette lipase permet la formation de l'inositol trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) à partir de phosphoinositol biphosphate (PIP2). L'IP3 va diffuser au niveau de récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique, permettant le largage de Ca^{2+} dans le cytosol. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induit la contraction des CMLs et donc une vasoconstriction. (Perez-Viscaino *et al.*, 2006) (Khimji & Rockey, 2010).

v. Thromboxane A₂

Le Thromboxane A₂ (TXA₂) est un composé dérivé de la prostaglandine H₂ mais contrairement à cette dernière, TXA₂ possède des propriétés aggrégantes et vasoconstrictives. Il se fixe sur son récepteur localisé au niveau des CMLs. Cette fixation induira l'activation de la phospholipase C. La voie activée de la PLC permettra la libération de calcium du réticulum endoplasmique, activant ainsi la kinase de la chaîne légère de la myosine. Cette activation aura pour conséquence une contraction des CMLs et donc une vasoconstriction (Fontana *et al.*, 2014) (Figure 10).

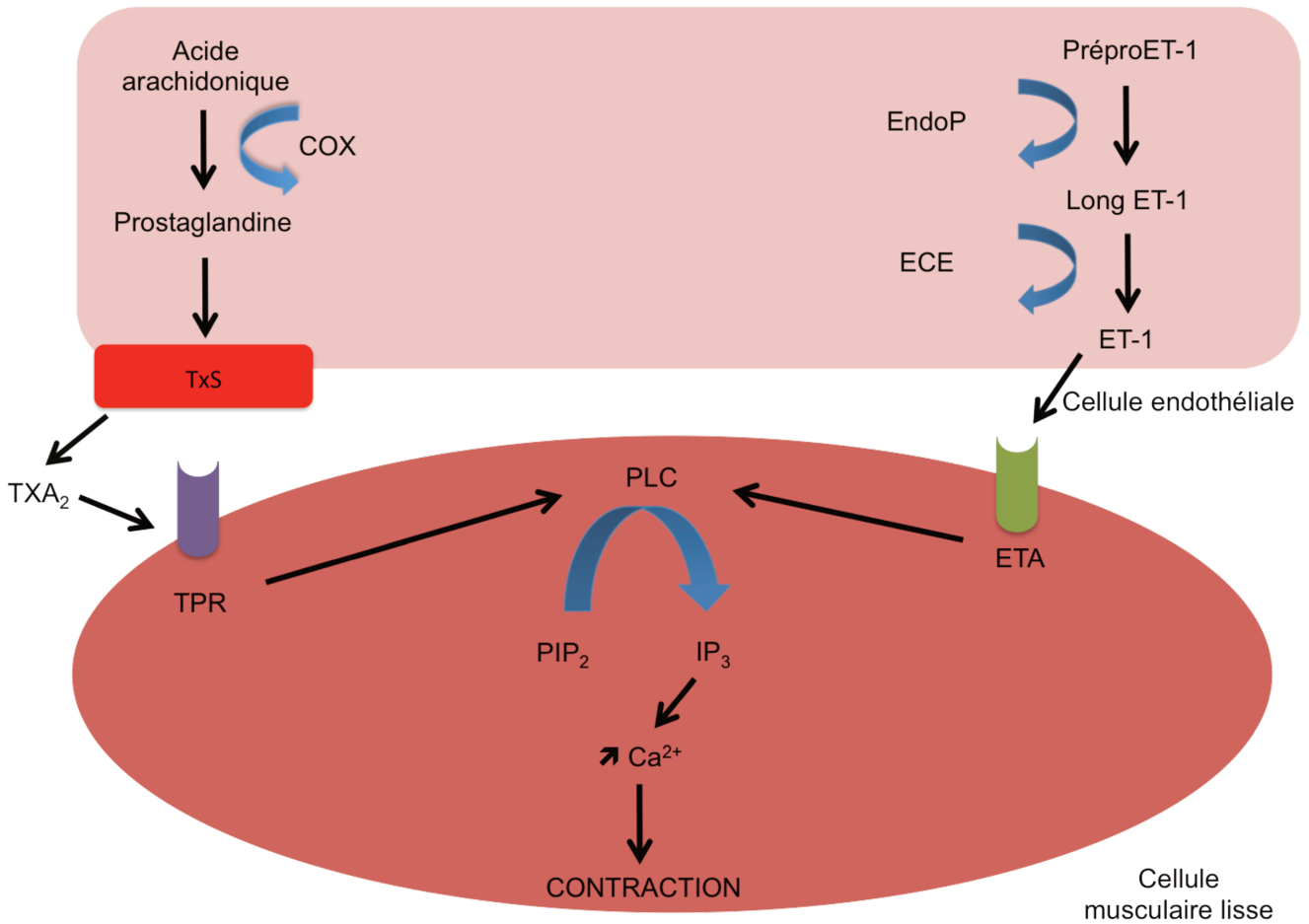


Figure 10) Mode d'action des facteurs vasoconstricteurs

Endop : endopeptidase ; ECE : enzyme de conversion de l'endothéline ; ET-1 : endothéline 1 ; ETA : récepteur à l'endothéline ; PLC : Phospholipase C ; PIP₂ : phosphatidyl-inositol diphosphate ; IP₃ : inositoltriphosphate ; TxS : synthase de thromboxane ; TPR, récepteur au thromboxane / prostaglandine

D. Dysfonction endothéliale

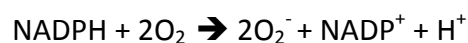
Les pathologies cardiovasculaires peuvent trouver leurs origines dans le dérèglement des fonctions des CE. On parle alors de dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale se traduit par un dérèglement des fonctions des CE, à savoir un défaut dans la perméabilité membranaire ou bien une dérégulation de la balance entre les vasodilatateurs et les vasoconstricteurs. Cette dysfonction endothéliale intervient sur différents mécanismes tels que l'augmentation du stress oxydant ou bien une augmentation de l'inflammation.

i. Dysfonction endothéliale et stress oxydant

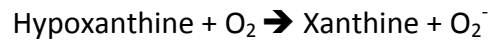
Les cellules produisent des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Ces composés sont plus connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène, ou bien Radical Oxygen Species en anglais (ROS). Il existe différents types de ROS comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyl (OH[·]) ou bien l'ion peroxynitrite (ONOO⁻). Cependant, tous ces ROS proviennent de l'anion superoxyde (O₂⁻) qui est le ROS le plus important (Higashi *et al.*, 2009). À faible concentration, les ROS peuvent agir en tant que messagers secondaires. Cependant, lorsque la concentration en ROS devient trop importante, un environnement pro-oxydant apparaît. Afin de contrer le stress oxydant, les cellules mettent en place différents mécanismes visant à limiter les effets délétères du stress oxydant.

L'O₂⁻ peut être produite par différents mécanismes :

- La NADPH oxydase. Ce complexe enzymatique membranaire appartient à la classe des oxydoreductases. Il existe différents isoformes de cette enzyme, allant de Nox1 à Nox5, et Duox1 à Duox2. Elle est également composée de sous-unités telles que p20phox, p40phox, p47phox et p67phox. La NADPH Oxydase catalyse la réaction suivante (Higashi *et al.*, 2014) :



- La xanthine oxydase. Cette enzyme se retrouve principalement au niveau du foie. La xantine oxydase catalyse l'hypoxanthine en xanthine, générant ainsi de l'O₂⁻ (Higashi *et al.*, 2014).



- Complexes mitochondriaux

La chaîne respiratoire de la mitochondrie est constituée de 4 complexes. Ces complexes participent à la production d'ATP *via* l'ATP Synthase. Lors du processus de respiration mitochondriale, les complexes I et III produisent de l'O₂⁻ qui sera libéré dans différents compartiments cellulaires. L'O₂⁻ issu du complexe I est libéré dans la matrice mitochondriale tandis que de l'O₂⁻ issu du complexe III est libéré au niveau de la matrice mitochondriale ou bien dans le cytoplasme (Kluge *et al.*, 2013).

- Découplage de l'eNOS

La BH4 est un cofacteur essentiel pour l'activité de l'eNOS. Ce cofacteur permet notamment l'augmentation de l'accrochage de l'arginine au niveau de l'enzyme. La BH4 stabilise également la forme active homodimérique de l'enzyme. La diminution de la concentration de BH4 ou sa déplétion induit un découplage de l'enzyme, se traduisant par une monomérisation de l'eNOS. En cas de découplage, la synthèse de NO est abrogée au profit de la production d'O₂⁻. L'O₂⁻ a la capacité de réagir avec le NO afin de produire l'ion peroxynitrite (ONOO⁻). En condition physiologique, l'ONOO⁻ est produit en faible dose, et agit comme donneur de NO. En revanche, à haute concentration, l'ONOO⁻ diminue la biodisponibilité du NO, favorisant ainsi le découplage de l'eNOS mais également une modification de son activité vasorelaxante.

Pour résumer, tel une boucle fermée, le découplage de l'eNOS favorise la production de ONOO⁻ qui lui-même favorise le découplage de l'eNOS (Luo *et al.*, 2014).

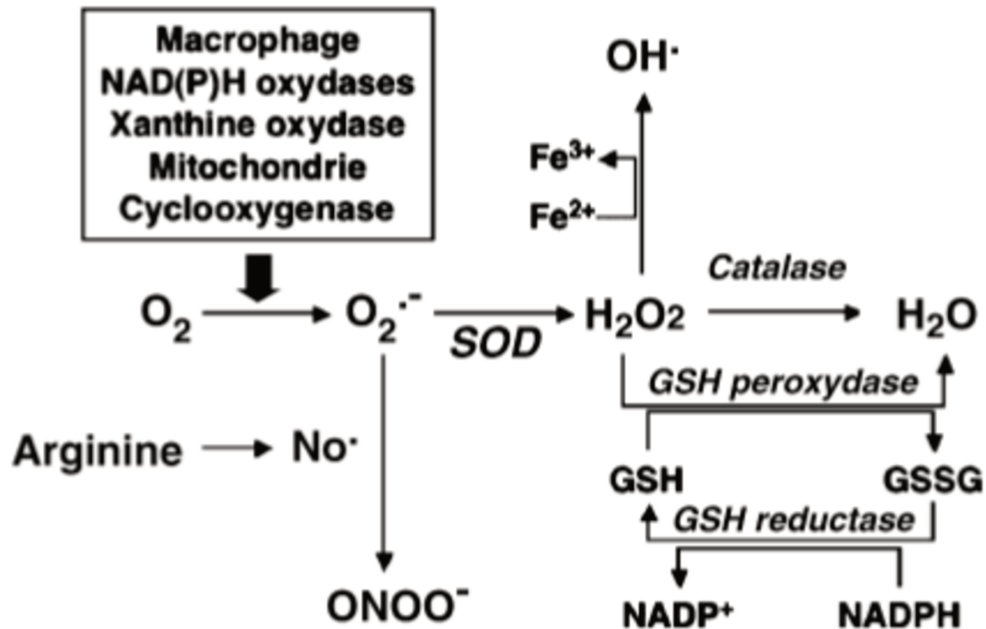


Figure 11) Schéma de formation de radicaux libres

SOD : Superoxyde Dismutase ; $ONOO^-$: Ion peroxynitrite ; H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène ; GSH : Glutathion

ii. Dysfonction endothéliale et Inflammation

Le développement d'un environnement inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoire au niveau des cellules endothéliales participe également à la dysfonction endothéliale.

En réponse à différents stimuli comme une infection bactérienne, les CE augmentent l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1. Ces molécules d'adhésion participent au recrutement de monocytes (Masseau & Bowles, 2015).

Les cytokines pro-inflammatoires favorisent également l'expression des molécules d'adhésion *via* la voie p65-NF- κ B. Ce facteur de transcription, en condition basale, est séquestré par l'inhibiteur I κ B. Cette séquestration empêche le facteur de transcription de transloquer au niveau du noyau. La levée de cette séquestration se fait par la phosphorylation de I κ B par IKK α . Le facteur de transcription p65-NF- κ B ainsi libérée dans le cytoplasme pourra être phosphorylé, permettant son activation et ainsi l'augmentation de l'expression des gènes-cible, comme les molécules d'adhésion et les cytokines pro-inflammatoires (Castellon & Bogdanova, 2016) (O'Shea & Perkins, 2008).

Le stress oxydant et l'environnement pro-inflammatoire peuvent donc être à l'origine de la dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale peut elle-même être à l'origine de pathologies cardiovasculaire comme l'athérosclérose.

E. Développement de l'athérosclérose

La première étape du développement de l'athérosclérose se trouve être la dysfonction endothéliale. Durant la phase précoce de l'athérosclérose, les LDL, synthétisées par le foie traversent la paroi intimale et s'y accumulent. En condition physiologique, les LDL pénètrent dans la paroi artérielle, sont captés par les monocytes et macrophages résidant dans la paroi artérielle et sont dégradés et évacués en particulier par l'intermédiaire du HDL. Dans le cas de l'athérosclérose, les LDL sont oxydés par les ROS tels que O₂⁻ et ONOO⁻, favorisant ainsi une réponse inflammatoire (Stancu *et al.*, 2012) (Figure 8). Cette réponse inflammatoire induit l'expression de molécules d'adhésion telles que V-CAM et I-CAM. Ces molécules permettent le recrutement de monocytes qui vont adhérer à la paroi endothéliale *via* les molécules d'adhésion puis la traverser grâce notamment à la protéine MCP-1. Ensuite, les monocytes changent de phénotype, se transformant en macrophages sous l'action du M-CSF. Ces macrophages, situés au sein de la paroi endothéliale, accentuent la réaction inflammatoire et l'augmentation du stress oxydant, favorisant ainsi le recrutement d'autres macrophages. Ces macrophages activés induisent également une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires pour

augmenter le recrutement de monocytes. Ces macrophages néo-formés phagocytent les LDL oxydés. Cependant, l'excès de LDL oxydés empêche leur totale dégradation ce qui aura pour conséquence un nouveau changement phénotypique : les macrophages se transforment en cellules spumeuses. La captation de ces LDL oxydés induit un signal pro-oxydant qui favorise la dysfonction endothéliale. (Libby *et al.*, 2009) Des stries lipidiques sont ainsi formées, ce qui constitue la première étape des lésions athérosclérotiques.

Puis ces cellules spumeuses s'accumulent au sein de la paroi endothéliale. La formation d'une plaque d'athérome, ou chape fibreuse, se crée afin de séparer ce noyau lipidique de la lumière artérielle. Cette plaque est composée de cellules musculaires lisses issues de la media. Ces cellules migrent au travers de la limitante élastique interne vers l'intima. Puis, grâce à des facteurs de croissance tels que PDGF, elles entrent en phase de prolifération qui sera suivie d'un nouveau changement phénotypique puisque les cellules musculaires lisses passeront d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (Insull, 2009).

Les plaques d'athéromes sont souvent asymptomatiques. Cependant, le développement de la plaque peut mener à une obturation des vaisseaux. Dans ce cas, un remodelage artériel est effectué afin de préserver la lumière artérielle : on parle alors de phénotype stable. Ce phénotype se caractérise par la présence d'un noyau lipidique relativement petit accompagné d'une plaque d'athérome importante. En revanche, dans les atteintes les plus graves, la plaque peut se rompre. Cette rupture est favorisée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui fragilise la plaque d'athérome. Dans ce cas de figure, le phénotype de la plaque est dit instable. À l'inverse du phénotype cité précédemment, ce phénotype se distingue par un important volume lipidique couplé à une chape fibreuse fine. Les cytokines fragilisent la stabilité de la chape fibreuse, facilitant ainsi la rupture de la plaque (Singh *et al.*, 2002). Cet événement libère les triglycérides contenus dans le noyau lipidique, participant ainsi à la formation d'un thrombus pouvant provoquer un infarctus du myocarde ou bien un accident vasculaire cérébral (Tabas *et al.*, 2015). (Figure 12)

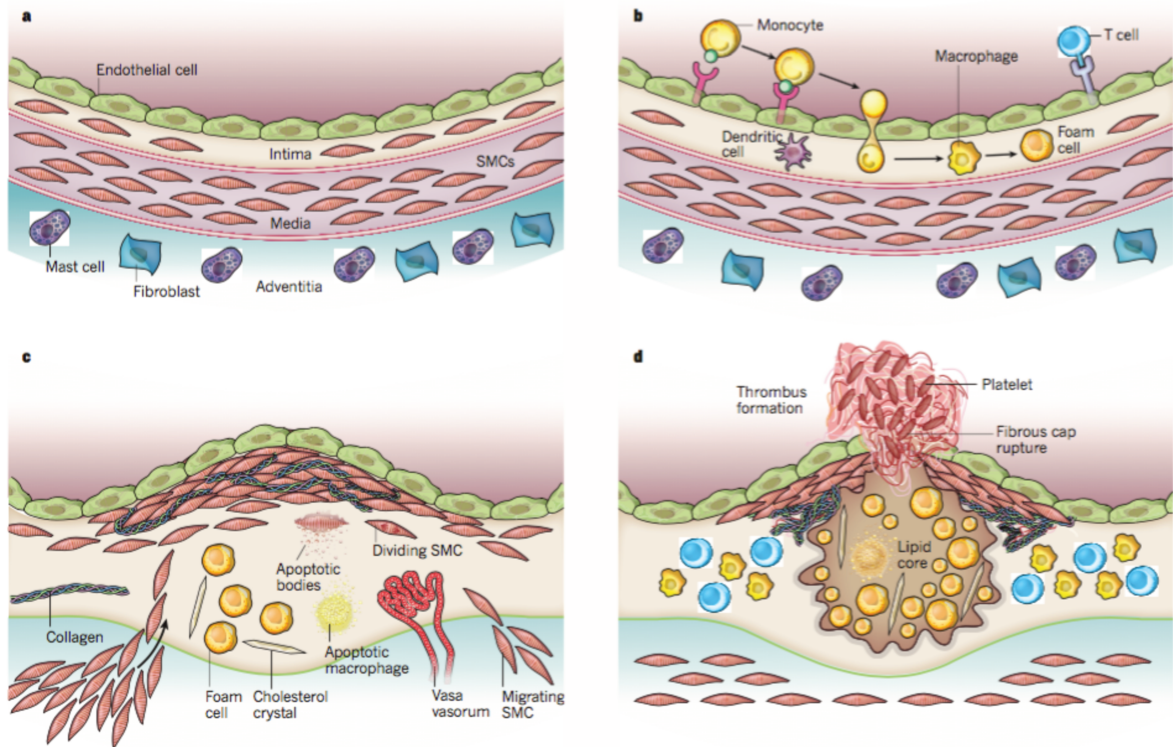


Figure 12) Évolution de la plaque d'athérome (Libby *et al.*, 2011)

a) Artère en condition physiologique

b) Le recrutement et le passage des monocytes au travers de la couche intimale sont les étapes précoces du développement de l'athérosclérose. Les monocytes changent de phénotype pour devenir des macrophages. Ces macrophages phagocytent les lipides et deviennent ainsi les cellules spumeuses

c) Les cellules musculaires lisses migrent au niveau de l'intima afin de séparer le noyau lipidique de la lumière artérielle. Des corps apoptotiques issus des macrophages et des cellules musculaires lisses peuvent apparaître et participer au développement du noyau lipidique

d) Le noyau lipidique se rompt, favorisant le largage des corps lipidiques au niveau de la circulation. La libération des corps lipidiques participe à la formation d'un thrombus, augmentant les risques d'infarctus ou d'anévrisme.

L'apoptose et l'endocytose peuvent également favoriser la rupture de la plaque :

- L'apoptose. Le développement du noyau lipidique nécessite un apport en nutriments qui se fait *via* micro-vaisseaux provenant de l'adventice. Ces vaisseaux, appelés *vasa vasorum*, entrent en processus angiogénique afin d'atteindre le noyau lipidique et ainsi, permettre l'apport des nutriments dans le noyau. Cependant, ces vaisseaux sont soumis à une inflammation

présente lors du développement du noyau lipidique, engendrant un processus apoptotique. L'apoptose peut être caspase-dépendante ou caspase-indépendante. Dans le 1^{er} cas de figure, l'apoptose est contrôlée par les protéines Bax et Bcl-2. Ces protéines sont impliquées dans la voie de signalisation de l'apoptose intrinsèque. La perméabilisation de la membrane mitochondriale induite par Bax, favorise le largage de cytochrome C. Cette protéine participe au clivage des caspases menant à la mort cellulaire (Youle & Strasser, 2008). La protéine Bcl2, quant à elle, s'hétérodimérise avec Bax afin de bloquer son activité pro-apoptotique (Czabotar *et al.*, 2014). Dans le 2nd cas de figure, des signaux de mort cellulaire induisent la formation du complexe Bak/Bax. Ce complexe participe à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, ce qui permet le largage de protéines tels que AIF et EndoG. Ces protéines vont se localiser dans le noyau et dégrader l'ADN pour induire une apoptose (Tait & Green, 2008). L'apoptose de ces vaisseaux peut être suivie d'une hémorragie dans le noyau lipidique, ce qui provoque une augmentation de la pression du noyau lipidique sur la plaque et favorise ainsi la rupture de la plaque d'athérome et la libération de corps lipidique dans la circulation (Xu *et al.*, 2015)

- L'efférocytose. C'est un processus au cours duquel les cellules apoptotiques ou nécrotiques sont phagocytées avant qu'elles ne puissent larguer des composants pro-inflammatoires (Erwig & Henson, 2007). L'efficacité de ce processus nécessite une élimination rapide des cellules apoptotiques par les phagocytes. Les cellules entrant en phase apoptotique libèrent la lysophosphatidylcholine, permettant le recrutement des macrophages. Les macrophages vont ensuite reconnaître les cellules apoptotiques qui n'ont pas de marqueurs présents à la surface de leurs membranes comme CD31 ou CD47. Les cellules apoptotiques seront ensuite internalisées et dégradées par une série de fusions entre les endosomes et les lysosomes déclenchée par la voie de signalisation Rac1 (Van Vré *et al.*, 2012). Cependant, dans les lésions athérosclérotiques avancées, l'apoptose macrophagique n'est pas correctement couplée à une élimination efférocitaire, favorisant ainsi la

libération du corps apoptotique et la formation d'un second corps nécrotique issu du macrophage. Ceci a pour effet l'augmentation de l'inflammation dans l'environnement athérosclérotique et donc à la fragilisation de la plaque d'athérome (Linton *et al.*, 2016).

F. Monoxyde d'azote et athérosclérose

La diminution de la biodisponibilité joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (Mudeau *et al.*, 2012):

- Oxydation des LDL : Les ROS intervenant dans l'oxydation des LDL au niveau intimal participent également à la diminution de la synthèse de NO en inhibant l'activité de l'eNOS. Cela aura pour conséquence une vasoconstriction accrue, accentuant le phénomène d'obstruction de la lumière artérielle par la plaque d'athérome. L'atteinte de l'eNOS induit également la formation d' O_2^- . Ce radical libre se lie par la suite avec le NO afin de produire du $ONOO^-$.
- Vasoconstriction : L'augmentation de la production de ces radicaux libres favorise également la diminution du tonus vasculaire ainsi que la suppression de l'effet antiagrégant plaquettaire.
- Prolifération des CMLs : Le NO possède la capacité d'inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. De ce fait, la diminution de la biodisponibilité du NO participe à la prolifération et à la migration des CMLs, ces étapes étant indispensables à la formation de la chape fibreuse.
- Formation du thrombus : Le NO inhibe la synthèse de thromboxane A₂ (TXA₂). TXA₂ est un dérivé de la prostaglandine H₂ responsable de l'aggrégation des plaquettes. En l'absence de NO, la concentration de TXA₂ augmente, favorisant la formation d'un thrombus pouvant entraîner une obturation des vaisseaux, voire un infarctus dans les cas les plus graves.

Il existe à ce jour différents traitements pour lutter contre l'athérosclérose, notamment la pose d'un stent. Cependant, ce type de traitement est invasif pour le patient. Un des moyens de lutter contre l'obésité est donc de traiter la principale source du problème, à savoir l'obésité.

IV. Traitements contre l'obésité

A. Traitement périphérique

De nos jours, différents traitements existent afin de lutter contre les désordres métaboliques liés à l'obésité, comme les thiazolidinédiones (Tontonoz & Spiegelman., 2008). Ces drogues se fixent au niveau du récepteur PPAR γ , permettant de corriger la résistance à l'insuline induite par l'obésité.

L'orlistat est également utilisé chez les patients dont l'IMC est supérieur à 28. Ce traitement permet de corriger l'hypertension et le taux de cholestérol circulant. L'orlistat est un inhibiteur de lipase pancréatique. En condition physiologique, cette lipase permet la dégradation des acides gras libres qui pourront par la suite être absorbés au niveau intestinal. L'utilisation de l'orlistat, de par ses propriétés lipase-inhibitrices, diminue l'absorption intestinale des lipides, ce qui aura pour conséquence une diminution de la prise de calorie. (Padwal *et al.*, 2007). Cependant, la majorité des patients bénéficiant de ce traitement n'est pas très observante et, après un an de traitement, seulement 10% des patients le poursuivent. Ce pourcentage chute à 2% au bout de 2 ans de traitement (Padwal *et al.*, 2007). De plus, les différents effets secondaires liés à la prise de l'orlistat (Diarrhée, Météorisme) obligent à prendre d'autres médicaments.

B. Traitement central

Le lorcasérine est un agoniste des récepteurs sérotoninergiques avec une plus haute affinité pour le récepteur de type 5HT-2c. Cette forte affinité pour le récepteur de type 5HT-2c limite les risques d'hallucination et les risques cardiaques provoqués par la liaison entre la lorcasérine et les récepteurs de type 5HT-2a et 5HT-2B, respectivement.

Cette fixation sur le récepteur 5HT-2c induit une activation des voies de signalisation anorexigéniques, avec une augmentation de la sécrétion de α -MSH. Cette fixation se traduira par une baisse de la prise alimentaire tout en limitant la dépense énergétique.

Lors d'un essai clinique d'une durée d'un an, 47,5% des patients traités ont subi une perte de poids de 5% et ce, de manière dose-dépendante. Concernant les patients traités avec le placebo, 20,3 % ont subi une perte de poids de 5% (Smith *et al.*, 2010). Malgré des résultats prometteurs, des effets secondaires apparaissent suite au traitement tels que des maux de tête ou des nausées. Ce traitement a également un risque cancérigène chez les animaux mais pas chez les humains (Colman *et al.*, 2012). Enfin, il est à noter que le comme l'orlistat, l'abandon du traitement par les patients est assez notable pour être souligné.

C. Chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique peut s'appliquer lorsque les différents traitements médicamenteux ne sont pas assez efficaces sur la perte de poids. Cette chirurgie consiste à diminuer la prise alimentaire des patients afin de limiter l'apport énergétique. Il existe à ce jour 3 types de chirurgie bariatrique : la pose d'anneau gastrique, la gastrectomie longitudinale et le court-circuit gastrique. Bien que des études aient démontré les bienfaits de la chirurgie bariatrique (perte de poids, diminution de la pression artérielle et du diabète de type II), ces opérations représentent un coût important et demeurent invasives pour les patients. De plus la chirurgie ne permet pas de corriger les habitudes alimentaires des patients (Arterburn & Courcoulas), 2014.

Malgré tous les traitements existants, l'obésité, au travers des différentes pathologies qu'elle induit (stéatose hépatique, diabète de type II, maladies cardiovasculaires), est à l'origine de millions de décès dans le monde chaque année.

La prévention apparaît donc comme primordiale afin de limiter les inconvénients des traitements médicamenteux et de la chirurgie bariatrique, mais aussi afin de lutter contre toutes les co-morbidités et le nombre croissant de décès liés à l'obésité.

En effet, les pathologies métaboliques associées à l'obésité peuvent être en grande partie évitées. Pour ce faire, des environnements propices doivent être développés pour convaincre la population, en facilitant l'accès plus aisé à une alimentation saine et à une activité sportive régulière.

L'OMS a ainsi adopté en 2014 la *Stratégie Mondiale de l'OMS pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé*. Cette stratégie a été établie afin de mettre en place les mesures nécessaires pour encourager la population mondiale à avoir une alimentation saine et équilibrée, ainsi qu'une activité physique régulière. Le projet de cette stratégie est d'établir un plan clair à long terme en vue d'une prévention efficace et durable. Les membres signataires se sont engagés à partager leurs informations scientifiques existantes sur les relations entre l'alimentation et l'exercice physique, mais également de se mettre d'accord avec différents partenaires afin de mettre en place une stratégie d'ordre mondiale. Ce plan d'action a pour objectif de réduire la progression du taux de l'obésité mondiale à leur niveau de 2010.

L'approche nutritionnelle représente alors une voie alternative de prévention, en permettant notamment de diminuer les risques de développement de pathologies liées à l'obésité ainsi que le nombre de décès associés à ces pathologies. Les industries agro-alimentaires peuvent jouer un rôle important dans la promotion des régimes alimentaires, notamment en proposant à tous les consommateurs des produits sains et nutritifs à prix abordable. En parallèle, des études réalisées par l'OMS ont démontré les effets bénéfiques de la consommation de végétaux dans la lutte contre l'obésité. C'est dans cette optique que s'inscrit le projet INUMAMET (Impact des **NU**triments sur les **MA**ladies **MET**aboliques).

V - Le projet INUMAMET

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence la relation inverse entre la consommation de certains aliments comme les fruits et légumes et les maladies cardiovasculaires grâce aux e.g. polyphénols qu'ils contiennent. Cependant, l'impact métabolique des nutriments ainsi que leurs cibles cellulaires restent à identifier. De plus, la variabilité de la qualité nutritionnelle liée à la fois à la diversité génétique des plantes sources de ces aliments mais aussi aux conditions de production et, ou de conservation est rarement prise en compte dans la mesure de cet impact.

Notre projet INUMAMET (**I**mpact des **N**utriments sur les **M**aladies **M**ETaboliques) commun Santé - Végétal vise donc à l'identification et à l'optimisation de l'impact de nutriments contre les maladies métaboliques et cardiovasculaires liées à l'obésité (principalement dans le développement de l'athérosclérose et ses conséquences). Il se propose d'aborder de façon intégrative l'impact de la variabilité végétale sur la santé humaine afin d'orienter la conduite des productions vers une composition optimisée de nutriments bénéfiques. En s'appuyant sur l'expertise régionale, il a établi son modèle de recherche à partir de composés issus de la carotte et de la pomme. En effet, la carotte est un « aliment santé » par excellence du fait de sa richesse en antioxydants (caroténoïdes, polyphénols) et en fibres. Quant à la pomme, elle est un riche pourvoyeur de fibres, glucides, acides organiques, polyphénols et minéraux. D'ailleurs des travaux épidémiologiques suggèrent que leur consommation participerait à la prévention de certains cancers, de maladies cardiovasculaires ou du diabète (Oude Griep *et al.*, 2011).

Ce projet regroupe différents pôles de recherche : la SFR Santé, le CRNH et l'IRHS. Ces pôles sont de grands acteurs ligériens de la Santé, de la Nutrition et du Végétal. L'originalité du projet INUMAMET porte sur la transversalité et la mise en réseau des compétences des pôles Santé et Végétal. Les équipes de l'IRHS ont apportées leur savoir-faire dans le contrôle et l'étude multi-échelle des productions végétales d'intérêt. Celles du CRNH et de la SFR Santé ont offert une approche intégrée clinique et expérimentale en abordant les problèmes de manière longitudinale à

tous les niveaux, moléculaire et cellulaire, puis chez l'animal et à terme chez l'Homme. Un autre aspect du projet INUMAMET porte sur l'intégration de l'aspect nutraceutique, c'est-à-dire sur le fait de tenir compte du mélange des molécules présentes dans les végétaux et non des molécules isolées. En effet, les effets bénéfiques observés lors de la consommation des végétaux sur la lutte contre l'obésité pourraient trouver leurs origines dans la synergie entre les différentes molécules composant le végétal. Enfin, les modèles choisis ont l'avantage d'être des produits de grande consommation, particulièrement présents dans les Pays-de-la-Loire pour leur activité de production. Il est aussi bon de préciser que, sur le plan économique, la France est le troisième pays producteur de pommes et le deuxième pays producteur de carottes en Europe.

Pour la branche CRNH et SFR Santé les résultats attendus de l'étude INUMAMET étaient les suivants

- La mise en évidence de cibles pertinentes des effets préventifs des maladies métaboliques par l'apport nutritionnel de la pomme et de la carotte.
- La connaissance de l'impact de la variabilité génétique et des itinéraires techniques de production et de conservation sur la valeur nutritionnelle de la pomme et de la carotte.
- la mise en place de fondements scientifiques rigoureusement démontrés pour la création d'allégations nutritionnelles et de santé au sujet de la pomme et de la carotte en vue d'une harmonisation de la législation européenne.

Cette mise en réseau entre les différents acteurs du projet permettra de caractériser l'impact de la variabilité génétique, mais également des différentes méthodes de culture et de conservation en vue d'améliorer la composition des végétaux en nutriments d'intérêt en terme de santé publique.

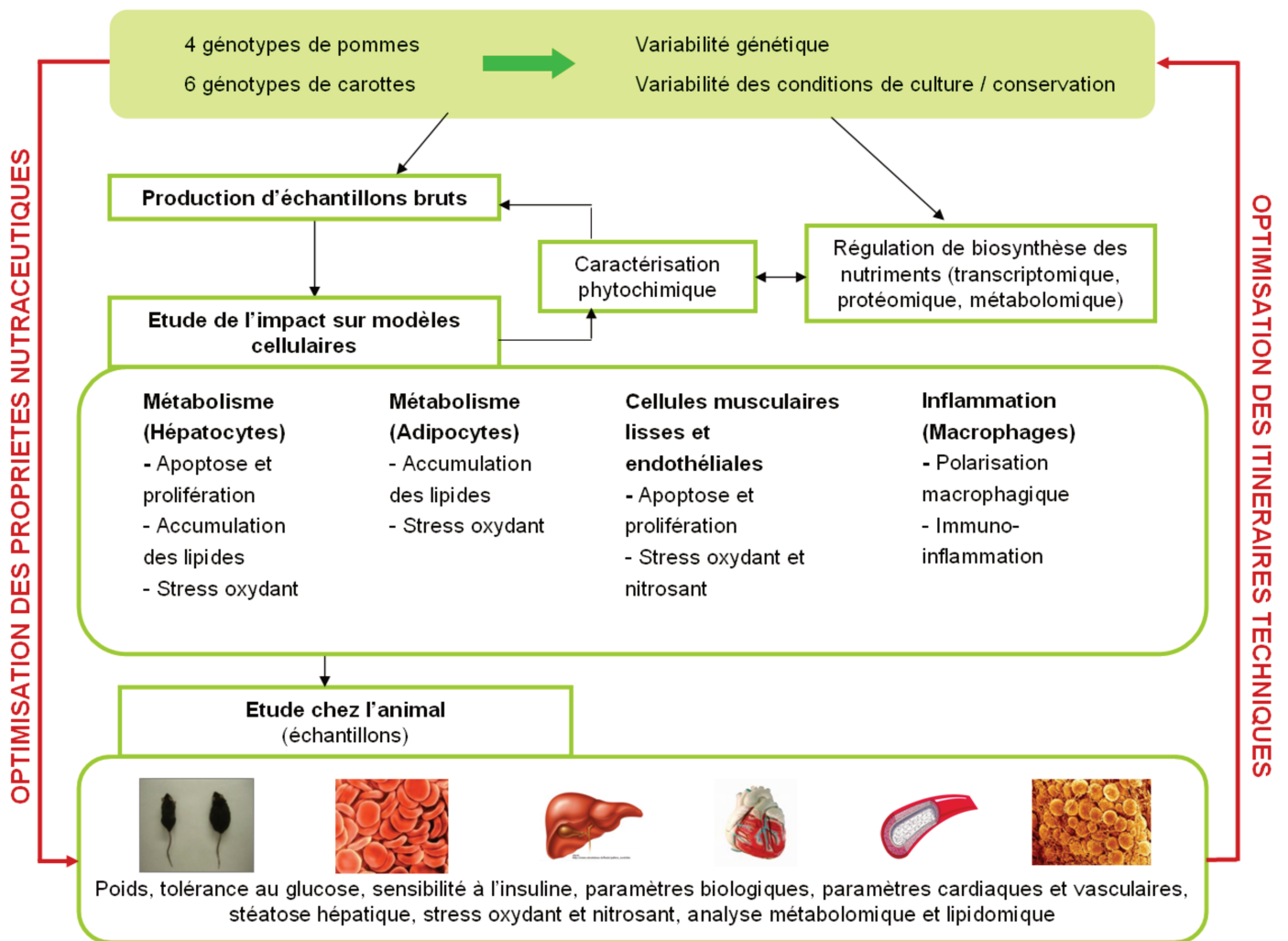


Figure 13) Organisation du projet INUMAMET j

Les végétaux sélectionnés sont la pomme et la carotte. Ces végétaux possèdent l'avantage d'être à la fois des produits de grande consommation, mais également des végétaux produits en quantité importante au niveau national et européen.

A. Présentation des modèles de l'étude

i. La pomme

La pomme, est le fruit du *Malus x domestica*, appartenant à la famille des rosacées. La pomme est, d'un point de vue botanique, considérée comme une baie. Elle est composée de 3 structures : l'épiderme, le mésocarpe plus connu sous le nom de parenchyme et l'endocarpe qui contient les pépins. Le mésocarpe constitue le tissu le plus consommé de la pomme.

a. Pomme et économie

Environ 20000 variétés sont répertoriées à ce jour, les plus connus étant la Gala, la Golden Delicious, la Granny Smith et la Pink Lady. Ces fruits se cultivent en climat tempéré. Au niveau mondial, environ 66 millions de tonnes de pommes sont produites chaque année. La Chine se retrouve en tête de la production avec une moyenne de 28 millions de tonnes. La France, quant à elle, produit environ 1,6 millions de tonnes par an. La pomme est le fruit le plus consommé en France avec une moyenne de 18 kg par an et par foyer et ce, sous toutes les formes possibles (Pomme entière, compote...).

b. Pomme et nutrition

Ce fruit possède une composition variée et riche de nutriments tels que les fibres, les glucides mais également les polyphénols.

1. Les Fibres

Les fibres alimentaires sont associées ou non dans la plante à de la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques. Elles ne sont pas digérées et ne sont donc pas absorbées par l'intestin. Elles jouent un rôle important dans la fonction gastro-intestinale en augmentant le volume des selles. Il existe 2 types de fibres :

- les fibres solubles dans l'eau ou polysaccharides telle que la pectine : ces fibres sont des polymères formés par un enchaînement d'hexoses, pentoses, desoxyhexoses ou d'acides héxuroniques. Elles ont un effet laxatif doux, permettant ainsi la croissance de bactéries saprophytes. Les fibres hydrosolubles ralentissent également le taux d'absorption de glucides et lipides, contribuant ainsi à la réduction de la glycémie et du taux de cholestérol sanguin (Slavin, 2013).
- Les fibres insolubles dans l'eau telle que la lignine : ces fibres améliorent la circulation des matériaux dans le système digestif et accélèrent le transit de par leur effet laxatif rapide. Elles augmentent la quantité d'eau dans les selles

et stimulent le péristaltisme intestinal. De plus ces effets laxatifs sont accompagnés d'un effet anti-inflammatoire (Kovarik *et al.*, 2013)

Les fibres alimentaires contenues dans les pommes sont riches en polysaccharides comme les pectines mais pauvres en lignine (Slavin, 2013).

- Les pectines représentent sont constituées d'hétéropolysaccharides et sont l'un des constituants de la paroi végétale.
- La lignine est un hétéropolymère d'alcools dérivée de la phénylalanine. Sa fonction principale est d'assurer de la rigidité au végétal.

2. Les Polyphénols

Les polyphénols sont des micronutriments que l'on retrouve au niveau de plusieurs végétaux. En tant que messagers secondaires des plantes, les polyphénols participent à la croissance de l'organisme végétal ainsi qu'à sa protection contre différents stress tels que les radiations UV et les stress biotiques, en produisant notamment des phytoalexines. Les polyphénols peuvent également participer à la défense des plantes contre ses prédateurs. Ils furent découverts par le scientifique hongrois Albert Szent-György. Prix Nobel de médecine en 1937, ce scientifique a découvert que le traitement par du jus de citron, source de flavonoïdes, diminuait les hémorragies liées à une hyperméabilité des vaisseaux chez les patients atteints de scorbut. Cependant, ce n'est que dans les années 1980 que les travaux sur les polyphénols ont pris de l'envergure, du fait de la découverte de leurs propriétés anti-oxydantes.

Ces molécules sont composées d'un noyau phénolique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles et pouvant être associé à différentes molécules telles que des acides carboniques. À ce jour, plus de 8000 molécules ont été répertoriés et classés selon leurs structures (Figure 14).

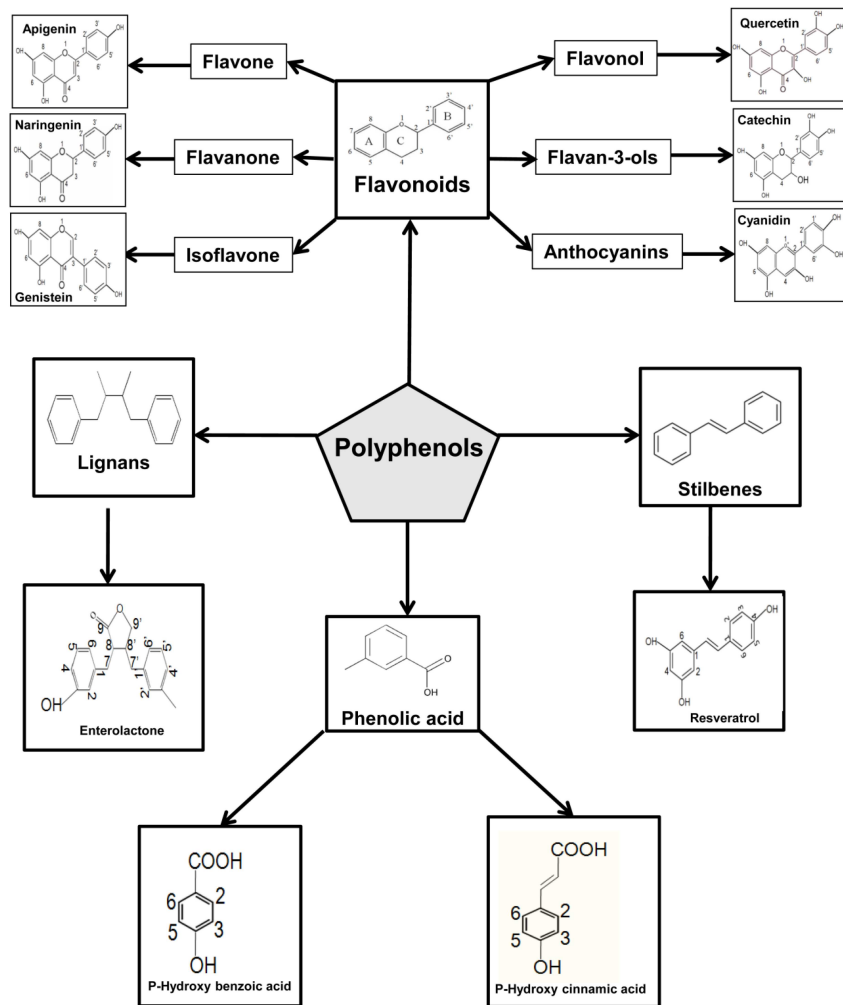


Figure 14) Classification des polyphénols (Abdal Dayem *et al.*, 2016).

Les polyphénols peuvent se répartir selon deux groupes : les non-flavonoïdes et les flavonoïdes (Abdal Dayem *et al.*, 2016).

- Les acides phénoliques

Il existe deux types d'acides phénoliques : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

Les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) sont composés d'un acide benzoïque et d'un cycle phénolique. Il existe 3 isomères de ce polyphénol en fonction de la position du groupement carboxyle (Del Rio *et al.*, 2013). Ces polyphénols sont présents surtout au niveau de certaines plantes aromatiques comme la cannelle avec une concentration d'environ 27 mg par kg d'écorce de cannelle.

Les acides hydroxycinnamiques, ou acides coumariques (C₆-C₃), sont dérivés des acides cinnamiques. Ils sont composés d'un noyau benzénique et d'un groupement hydroxyle. Trois isomères de ce polyphénol existent, dépendamment de la position du groupement hydroxyle. Ces polyphénols sont généralement retrouvés sous forme conjuguée. L'acide caféique représente la quasi-totalité des acides hydroxycinnamiques présents dans les végétaux (Alam *et al.*, 2016).

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent à eux-seuls plus de la moitié des composés polyphénoliques. Les flavonoïdes sont composés de 2 noyaux aromatiques liés par une chaîne de 3 carbones. Ces composés se retrouvent majoritairement au niveau des végétaux ainsi qu'au travers de plusieurs organes tels que la peau des fruits, les tiges ou bien encore les feuilles. Ces polyphénols sont classés selon la structure de l'hétérocycle formé par les chaînes carbonées (Mansuri *et al.*, 2014).

- o Les flavones, flavonols et les flavanones

Caractérisés par une double liaison en position 2-3 accompagnés d'un noyau aromatique en position 2, les flavones sont des composés phénoliques présents majoritairement sous forme de glycosides. Ces polyphénols, bien que moins répandues que les flavonols, sont présentes au niveau des céréales et les herbes. Sa consommation est évaluée à environ 25mg par jour, les sources principales étant le persil et le céleri (Cermak *et al.*, 2006).

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus répandus dans le monde végétal, bien que présentes en faible concentration. Tout comme les flavones, ces polyphénols présentent une double liaison en position 2-3. Cependant, ils présentent un groupement hydroxyle en position 3. Cette classe est majoritairement représentée par la quercétine. Ces polyphénols se retrouvent dans plusieurs fruits et légumes, la source la plus riche étant la câpre avec une moyenne de 490mg par 100g de matière

fraîche (Cermak *et al.*, 2006). Les flavonols se retrouvent également dans différentes boissons telles que le vin rouge ou le thé vert (Manach *et al.*, 2004).

Les flavanones sont des polyphénols se trouvant principalement au niveau des agrumes. Plus précisément, ces polyphénols sont concentrés dans les parties solides du fruit. Ces polyphénols sont caractérisés par la présence d'une chaîne saturée en position C3 et d'un atome d'oxygène en position C4. Entre 40 et 100 mg de flavanones sont trouvés dans le jus d'orange ; cette quantité est multiplié par 5 dans la chair de l'orange (Kay *et al.*, 2017).

- Les flavanols et procyanidines

Les flavanols sont présentés sous plusieurs formes : monomérique ou polymérique. La forme monomérique, est également connue sous le nom de catéchine. Les principaux monomères que l'on retrouve dans les végétaux sont la catéchine et sa forme isomérique, l'épicatéchine. Ces polyphénols se caractérisent par la présence de 2 carbones asymétriques en position 2 et 3. La source principale de ces polymères se trouve dans le thé vert et le chocolat, avec une concentration évaluée respectivement à 800mg/l et 600mg/l (Manach *et al.*, 2004).

Ces polyphénols peuvent être hydroxylés et ainsi former des gallocatéchines et épigallocatéchines. Ces derniers peuvent à leur tour être estérifiés et former les oligomères épigallocatéchine 3-gallate et épicatechine 3-gallate. Enfin, la polymérisation des catéchines et épicatechines permet la formation de proanthocyanidines, également connus sous le nom de tanins condensés. Les proanthocyanidines les plus répandues sont les procyanidines : ces polymères sont composés de catéchine et d'épicatéchines et se retrouvent en quantité importante au niveau des pommes (de Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

- Les anthocyanes

Les anthocyanes, composées de 3 cycles aromatisés conjugués, sont des polyphénols hydrosolubles responsable notamment de la pigmentation de plusieurs fruits, comme par exemple le raisin ou bien les baies telles que les myrtilles. La teneur de ces polyphénols, majoritairement concentré dans la peau du fruit est plus importante dans les baies de sureau, avec une concentration pouvant aller jusqu'à 10g/kg de matière fraîche.

- Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques composés de deux noyaux phénoliques. Ces composés sont faiblement solubles dans l'eau. Les stilbènes se retrouvent dans différents végétaux, cependant la vigne et le raisin sont les sources les plus importantes de stilbènes. Le représentant le plus connu des stilbènes est le resvératrol. Celui-ci peut se retrouver sous deux formes : sous forme *trans* ou sous forme *cis* (Shen *et al.*, 2009).

- ii. La carotte

La carotte, ou *Daucus carotta* est une plante bisannuelle appartenant à la famille des Apiacées. C'est un légume mondialement consommé qui se cultive en région tempérée. Il existe à ce jour plus de 500 variétés répertoriées pouvant être divisées en 2 groupes :

- Les carottes occidentales sont de phénotype jaune, orange ou rouge
- Les carottes orientales sont de phénotype jaune et violet

Les carottes font parties des végétaux les plus cultivés dans le monde. Leur production mondiale est en constante augmentation (Simon *et al.*, 2008).

a. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux de la famille des terpénoïdes. Ces molécules participent au sein des végétaux à la photosynthèse ainsi qu'à la photoprotection. Plus de 600 caroténoïdes différents ont été caractérisés. Cependant, seulement 40 sont présents dans l'alimentation. Les caroténoïdes sont répartis en 2 groupes : les carotènes et les xanthophylles. La différence entre ces deux classes consiste en la présence d'oxygène au niveau des xanthophylles, donnant une couleur jaune aux végétaux la possédant en quantité importante.

Le bêta-carotène et le lycopène

Le carotène est un pigment orange. Plusieurs isoformes de carotène existent, cependant, la forme la plus représentée est le bêta-carotène. Le bêta-carotène se retrouve en grande quantité dans les carottes, mais peut aussi se retrouver dans les poivrons ou la tomate. Au sein du végétal, le bêta-carotène permet aux végétaux de lutter contre le stress oxydant pouvant être induit par un excès d'énergie de la chlorophylle lors de la photosynthèse. La source de bêta-carotène se retrouve principalement dans la nourriture et son absorption se réalise en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le végétal est digéré, permettant la libération du bêta-carotène dans la matrice alimentaire. La cuisson peut améliorer la biodisponibilité du bêta-carotène en dégradant les membranes cellulaires, exposant ainsi le bêta-carotène aux enzymes digestives (Reboul, 2013). Ensuite le bêta-carotène est solubilisé et incorporé dans des micelles. Celles-ci vont diffuser de manière passive au niveau des entérocytes. Enfin, le bêta-carotène va ensuite être transloqué dans des chylomicrons afin d'être largué dans la circulation lymphatique et transporté vers le foie (Harrison, 2012).

Le lycopène est un caroténoïde non pro-vitaminique A. N'étant pas disponible dans l'organisme humain, le lycopène trouve sa source dans les végétaux et les micro-organismes.

B. Propriétés thérapeutiques des polyphénols et des caroténoïdes

i. Effets des polyphénols et caroténoïdes sur le stress oxydant

Les radicaux libres sont des molécules instables qui sont la principale cause du stress oxydant. Ces molécules participent au développement de nombreuses pathologies telles que le cancer, les pathologies cardiovasculaires et le diabète. Longtemps considérés comme des éléments toxiques, diverses études récentes ont démontré que les radicaux libres agissaient comme des messagers secondaires. Plusieurs études ont démontré les effets bénéfiques des polyphénols sur le stress oxydant. Divers polyphénols, comme la quercétine ou le resvératrol ainsi que les caroténoïdes peuvent agir de plusieurs manières. Les polyphénols ont une forte capacité de capter les anions superoxyde (Perez-Viscaino *et al.*, 2006). La quercétine et le resvératrol favorisent également l'expression d'enzymes anti-oxydantes via l'augmentation de l'expression et de l'activité de Nrf2. En condition physiologique, cette protéine est captée par la protéine KEAP1 et ubiquitinée. Le complexe est transporté au niveau du protéasome où le complexe sera dégradé. En revanche, en condition de stress, le système d'ubiquitination est dégradé, permettant à Nrf2 de transloquer au niveau du noyau. Une fois le noyau atteint, Nrf2 forme un complexe avec les protéines Maf et Jun et ce complexe se fixe au niveau de la région promotrice ARE (Antioxidant Response Element) des gènes codant pour des enzymes antioxydantes (Gorrini *et al.*, 2013) (Seo & Lee, 2013).

Des études ont démontré le potentiel de la quercétine et du resvératrol à diminuer le stress oxydant et ce, de plusieurs manières. En effet, ces polyphénols ont la capacité d'induire la transcription de Nrf2. Ces composés interagissent également avec le site d'accrochage de Nrf2 sur Keap1, inhibant ainsi la dégradation de Nrf2. Ces effets se retrouvent sur différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, les hépatocytes et les adipocytes. (Kobori *et al.*, 2016) (Spanier *et al.*, 2009) (Ji *et al.*, 2015) (Ben Dor *et al.*, 2005).

ii. Effets des polyphénols et caroténoïdes sur les pathologies métaboliques

Des études *in vitro* ont démontré que des composés polyphénoliques tels que la quercétine amélioraient la translocation du récepteur au glucose GLUT-4 vers la membrane plasmique. Cette translocation se fait suite à l'activation par la quercétine de la voie AMPK au niveau des adipocytes (Bahadoran *et al.*, 2013). La quercétine et le résvératrol sont également impliqués dans l'inhibition de l'adipogénèse. Utilisés séparément, ces polyphénols ont la capacité d'inhiber l'expression des gènes adipogéniques PPAR- γ et C/EBP α . Cependant, lorsque ces polyphénols sont utilisés simultanément, la diminution de ces gènes est plus importante, suggérant ainsi un effet synergique des polyphénols (Yang *et al.*, 2008). Ces effets se retrouvent également au niveau des hépatocytes. L'utilisation de la quercétine dans un modèle murin diabétique *in vivo* a démontré que le polyphénol améliorerait de manière significative la phosphorylation du récepteur à l'insuline, induisant ainsi la translocation du récepteur GLUT-4 à la membrane des hépatocytes (Li *et al.*, 2013). Les polyphénols peuvent également être impliqués dans le métabolisme des glucides. En effet, la catéchine diminue la production de glucose *via* la diminution de l'expression dans le foie de la glucokinase qui est une enzyme impliquée dans la glucogénèse.

Les polyphénols et caroténoïdes sont également impliqués dans la régulation de la production d'adipokines. Le lycopène et le résvératrol, au niveau des adipocytes, corrigent le déficit d'adiponectine caractéristique des patients obèses en favorisant la production d'ARNm de l'adiponectine (Luvizotto *et al.*, 2015) (Costa Cdos *et al.*, 2011).

Les polyphénols et caroténoïdes corrigent aussi la résistance à la leptine présente chez les patients obèses. Pour rappel, la résistance à la leptine inhibe la phosphorylation de STAT3, impliquée dans l'activation de gènes anorexigéniques. L'équipe de Franco *et al* a démontré que, dans une étude *in vivo* chez le modèle murin, la résistance à la leptine induite par un régime riche en graisse était levée grâce à la phosphorylation de STAT3 induite par le resvératrol.

iii. Effets des polyphénols et caroténoïdes sur les pathologies cardiovasculaires

Des études épidémiologiques ont démontré un lien entre la consommation de polyphénols et caroténoïdes au travers des végétaux et la diminution du risque de pathologies cardiovasculaires (Di Castelnuovo *et al.*, 2002) (Voutilainen *et al.*, 2006). Ces études ont démontré que la diminution des risques cardiovasculaires était liée à la consommation de vin rouge qui possède une concentration importante de polyphénols et d'un régime riche en caroténoïdes, respectivement (?). L'athérosclérose est la principale maladie cardiovasculaire déclenchée par l'activation des cellules endothéliales par les radicaux libres. Cela permet l'adhésion des monocytes sur la monocouche endothéliale et la production de cytokines pro-inflammatoire favorisée par la formation de cellules spumeuses lors du développement athérosclérotique. Des études *in vitro* ont démontré notamment que certains polyphénols et caroténoïdes comme le resvératrol ou bien les catéchines diminuaient l'expression des molécules adhérentes exprimées à la surface des cellules endothéliales *via* la voie NF- κ B. Cette diminution permet d'inhiber le passage des monocytes au travers de la couche endothéliale (Kishimoto *et al.*, 2013). La dysfonction endothéliale est également responsable de l'athérosclérose. Cette dysfonction se caractérise par la dérégulation de la balance entre les agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Des études ont démontré que le resvératrol corrigeait la dysfonction endothéliale *in vitro*. De manière plus précise, ce polyphénol favorise la production de Ca^{2+} , stimulant ainsi l'ouverture des canaux potassiques (Li *et al.*, 2000). Des études *in vivo* vont également dans ce sens. Des modèles de souris déficientes en apolipoprotéine E ont été soumises à un régime gras supplémenté ou non avec de la catéchine issue de thé vert ont démontré une diminution des lésions liées à la formation de la plaque d'athérome. (Miura *et al.*, 2001). Le développement athérosclérotique peut également être corrigé par l'adiponectine. En effet, cette hormone participe à l'inhibition de la formation de la plaque d'athérome par deux mécanismes, à savoir l'inhibition de l'expression des

protéines d'adhésion à la surface des cellules endothéliales mais aussi en inhibant l'entrée du cholestérol au niveau de l'intima (Kadowaki *et al.*, 2014).

Les polyphénols et les caroténoïdes ont donc la capacité de stimuler la production d'adiponectine et donc, de prévenir du développement de l'athérosclérose (Luvizotto *et al.*, 2015) (Costa Cdos *et al.*, 2011).

iv. Effet de la consommation de pommes et de carottes

Une étude a permis de déterminer l'influence de la consommation de pommes sur le profil lipidique de patients en surpoids (Vafa *et al.*, 2011). Quarante-six patients ont été sélectionnés et divisés en 2 groupes : Le 1^{er} groupe recevait une portion de Golden Delicious de 300g, de préférence non épluchée, par jour pendant 8 semaines. Le 2nd groupe avait le même régime alimentaire que le 1^{er}, exceptée la portion de la pomme. Des prélèvements sanguins réalisés au début et à la fin de l'étude ont montré une diminution significative du taux de triglycérides et de VLDL circulants pour le groupe consommant la portion de pomme.

Une autre équipe a étudié, sur une période de 10 ans, la consommation de végétaux en fonction de leurs couleurs (Figure 15).

Table 1. Classification of fruit and vegetables according to type and colour group*

| Colour group | Fruit and vegetable type | Fruit and vegetable items |
|---------------|---|--|
| Green | Cabbages (18 %) | Broccoli, Brussels sprouts and green cabbages (Chinese, green, oxheart, sauerkraut, savoy and white) |
| | Dark green leafy vegetables (15 %) | Kale and spinach |
| | Lettuces (13 %) | Endive and lettuce |
| | Other green fruit and vegetables (54 %) | French beans, green sweet pepper, honeydew melon and kiwi fruit |
| Orange/yellow | Citrus fruits (78 %) | Citrus fruit juices, grapefruit, orange and tangerine |
| | Deep orange fruit and vegetables (22 %) | Cantaloupe, carrot, carrot juice and peach |
| Red/purple | Berries (41 %) | Cherries, grapes, grape and berry juices and strawberries |
| | Red vegetables (59 %) | Red beet, red beet juice, red cabbage, red sweet pepper, tomato, tomato juice and tomato sauce |
| White | Hard fruits (55 %) | Apple, apple juice, apple sauce and pear |
| | Allium family bulbs (10 %) | Garlic, leek and onion |
| | Other white fruit and vegetables (35 %) | Banana, cauliflower, chicory, cucumber and mushroom |

Figure 15) Classification des végétaux en fonction de leurs couleurs (Oude Griep *et al.*, 2011)

Plus de 20000 personnes ont participé à cette étude dont les résultats ont démontré que la consommation de végétaux diminuait de manière significative les risques de maladies cardiovasculaires. Dans ce groupe, la consommation de carottes

contribuait encore plus à faire baisser les risques cardiovasculaires (Oude Griep *et al.*, 2011).

Les études citées précédemment ont mis en évidence la relation inverse entre la consommation de végétaux et pathologies métaboliques associées à l'obésité. Les composés issus de ces végétaux (polyphénols, caroténoïdes) peuvent rendre en partie compte des effets observés. Cependant, l'impact métabolique des nutriments ainsi que leurs cibles cellulaires restent à identifier. De plus, la variabilité de la qualité nutritionnelle engendrée par la diversité génétique ou les conditions de culture et de conservation sont rarement prises en compte dans les effets observés lors de ces études.

C. La stratégie INUMAMET

Le pôle Végétal représenté par l'IRHS, en tant qu'experte de la diversité génétique et phénotypique des espèces *Malus domestica* et *Daucus carota*, va caractériser l'interaction génotype-environnement sur la qualité nutritionnelle de la pomme et la carotte, modèles d'étude des productions végétales en Pays-de-la-Loire et produits très consommés. L'impact de conditions de culture représentatives des évolutions environnementales et de conditions de conservation représentatives sera évalué à différents niveaux (métabolomique, transcriptomique, protéomique).

Le pôle Santé va étudier l'impact des nutriments issus de la pomme et de la carotte sur les hépatocytes, les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et décoder les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. Cela permettra de mettre en place des protocoles expérimentaux adéquats pour le criblage cellulaire. Les effets métaboliques et protecteurs cardiovasculaires seront évalués sur les modèles animaux sur la base des nutriments les plus actifs au niveau cellulaire. Ce projet jettera les bases expérimentales permettant à terme d'analyser l'impact des apports nutritionnels de la pomme et de la carotte, en tant que « panier nutraceutique » dans les complications vasculaires et métaboliques chez les patients volontaires dans des études préliminaires pour valider la preuve de concept.

Les équipes de Santé et du Végétal, regroupées en consortium, mettront en commun leurs méthodes et leurs équipements de biochimie, de biologie moléculaire, de métabolomique, d'imagerie et de microscopie.

La stratégie du projet vise à étudier les nutriments sous forme d'extraits végétaux afin d'être proche d'une réalité biologique car la population consomme des fruits et des légumes avec toutes les molécules qui les composent. De plus, l'effet bénéfique du végétal pris dans sa totalité, peut être supérieur à celui de la somme de ses constituants pris séparément. C'est ce que l'on appelle la synergie entre les différents principes actifs qui peut avoir des effets bénéfiques. A titre d'exemple, on peut dire que les effets de l'utilisation simultanée de quercétine et resvératrol sur l'adipogenèse sont plus importants que lorsque ces polyphénols sont utilisés séparément (Yang *et al.*, 2008).

Ce projet possède aussi une stratégie s'appliquant au champ pharmaceutique en orientant son étude vers les facteurs de risque de l'hypertension artérielle et du diabète.

INUMAMET considère les nutriments sous forme de fraction végétale et prend en compte l'optimisation nutraceutique.

OBJECTIFS

Les objectifs du projet INUMAMET sont d'obtenir une meilleure connaissance de l'interaction génotype-environnement pouvant déterminer la qualité du produit et sa maîtrise, mais également de caractériser les effets des échantillons de carottes et de pommes dans une approche intégrative.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des conditions de culture et de conservation couplé à la variabilité génétique de deux végétaux (pommes et carottes) sur des modèles cellulaires dont la fonction est altérée lors de l'obésité (hépatocytes et adipocytes). Pour ce, quatre variétés de pommes (Gala, Golden Delicious, Granny Smith et Pink Lady) ont été stockées selon quatre modes de conservation tandis que six variétés de carottes (Karotan, Bolero, Presto, Deep Purple, Kintoki et Blanche des Vosges) ont été cultivées selon quatre méthodes différentes. Ces végétaux ont été fournis par l'IRHS.

Afin d'évaluer l'impact des critères cités précédemment, une mise en place de protocoles adéquats pour le criblage cellulaire dans différents processus métaboliques tels que l'apoptose, l'accumulation des lipides et le stress oxydant à partir d'échantillons de pommes et de carottes sera effectuée. Cette approche permettra de mettre en place des protocoles expérimentaux adéquats pour le criblage des échantillons les plus efficaces.

Dans un second temps, suite au criblage réalisé au niveau des cellules endothéliales par des membres du laboratoire, les deux échantillons de pommes ayant le plus haut potentiel anti-apoptotique sur les cellules endothéliales sont sélectionnés afin de déterminer leurs mécanismes d'actions. Pour ce faire, différents activateurs ou inhibiteurs de la voie apoptotiques seront utilisés en présence des échantillons végétaux. L'apoptose des cellules endothéliales est impliquée dans le développement de plusieurs pathologies métaboliques comme le diabète de type II ou bien l'athérosclérose. Un protocole expérimental a été mis en place afin de

déterminer le mode d'action des échantillons sélectionnés sur l'apoptose des cellules endothéliales.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Réactifs et échantillons

Les échantillons fournis par l'IRHS se présentent sous forme lyophilisée pour les pommes et sous forme broyée pour les carottes. Le processus de lyophilisation aurait, pour les carottes, induit une perte significative de leur teneur en caroténoïdes. Ces échantillons sont ensuite solubilisés dans de l'éthanol (EtOH) (Mingorance *et al.*, 2008) ou du Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Lavaud *et al.*, 2012) afin de déterminer le solvant le plus efficace en terme de solubilisation des échantillons. Ces solvants ont également été sélectionnés pour leurs capacités à solubiliser les composés hydrophiles et hydrophobes issus des différents végétaux. Pour s'affranchir de la toxicité du solvant, il est proposé de limiter leur concentration à 0,1%. Les échantillons sont solubilisés à l'aide d'un vortex pendant 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière pour limiter l'oxydation de nos échantillons. Ces échantillons sont filtrés et testés à la fois avec une haute concentration (HC) et une faible concentration (LC), à savoir 10^{-2} et 10^{-5} g/L pour pouvoir déterminer ou non si la concentration est impliquée dans les effets que l'on pourrait observer. De plus, des études réalisées au sein du laboratoire ont déjà mis en évidence les effets contradictoires d'un même composé en fonction de sa concentration (Andriantsitohaina *et al.*, 2012).

Les variétés de pommes ont été soumises à différentes conditions de conservation :

- Post-Récolte (HR)
- Froid Normalisé (FN) : Conservation de 4 mois à 0,5°C
- Atmosphère Contrôlée (AC : Conservation de 4 mois à 0,5°C + 2% O₂ + 2% CO₂
- X-Ultra Low Oxygen (XO) : Conservation de 4 mois à 0,5°C + 0,8% O₂ + 0,8% CO₂

Suite à ces conditions, les pommes sont mises à température ambiante pendant 7 jours afin de mimer le délai nécessaire pour que le fruit arrive à destination de l'assiette du consommateur. Ensuite, les échantillons sont ensuite lyophilisés (Figure 16).

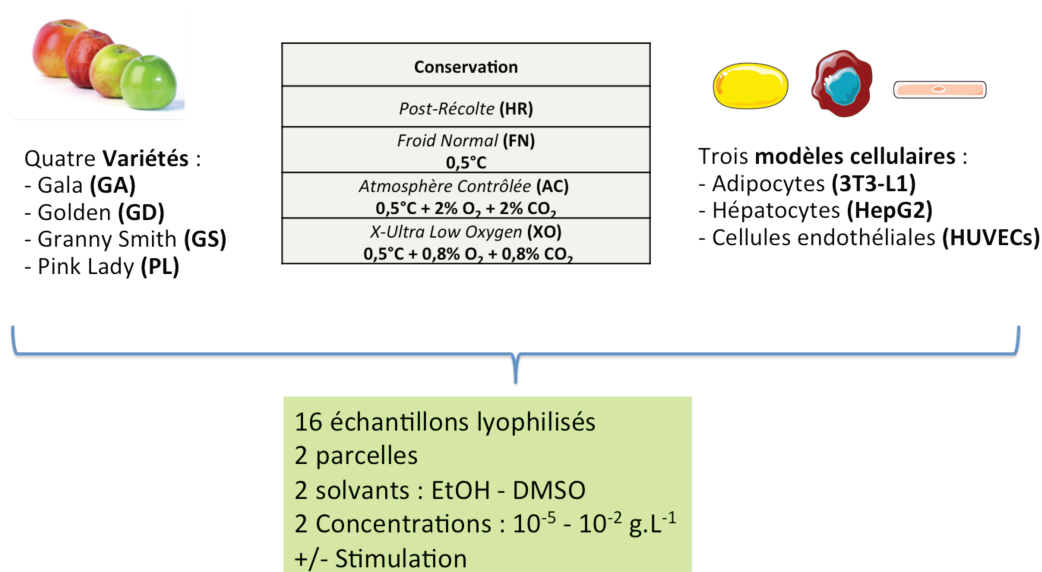


Figure 16) Mise en place du criblage des échantillons de pommes

Les variétés de carottes étudiées sont Karotan (KA), Bolero (BO), Presto (PR), Deep Purple (DP), Kintoki (KI) et Blanche des Vosges (BV). Ces végétaux sont cultivés pendant une période de 16 semaines et sont soumis à plusieurs conditions de cultures (Figure 17) :

- Contrôle (C) : Conditions standard de culture
- Stress Hydrique (SH) : Carottes soumises à une restriction hydrique
- Stress Biotique (SB) : Carottes soumises à une inoculation du champignon pathogène *Alternaria dauci*.
- Stress Croisés (SC) : Carottes soumises simultanément aux conditions SH et SB

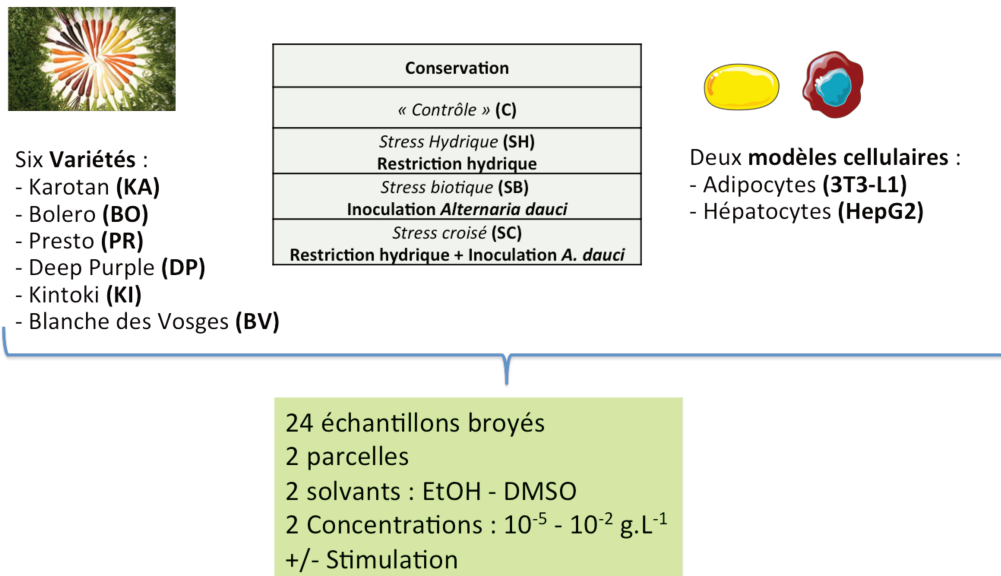


Figure 17) Mise en place du criblage des échantillons de carottes

II. Culture Cellulaire

Les hépatocytes sont maintenus dans un incubateur contenant 5% de CO₂ et cultivés en plaque 96 puits pour le stress oxydant et l'accumulation des lipides et 24 puits pour l'apoptose dans un milieu de culture (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High ou DMEM Glucose 4,5%, Lonza) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal décomplémenté (SVF) (Gibco), 1% de L-Glutamine, 1% de Na-Pyruvate et 1% de Streptomycine/Pénicilline (Lonza). Dans le cas des tests apoptotiques, les cellules à confluence totale sont traitées préalablement pendant 30 minutes en présence des échantillons de pommes et de carottes à différentes concentrations (10^{-2} et 10^{-5} g/L) et en présence ou non d'agent proapoptotique Actinomycine D (ActD) pendant 24h.

Pour le test d'accumulation de lipides au niveau des hépatocytes, les cellules à confluence totale sont traitées préalablement pendant 30 minutes en présence des échantillons de pommes et de carottes à différentes concentrations (10^{-2} et 10^{-5} g/L) et en présence ou non ou d'acide oléique (500μM) pendant 24h.

Concernant le stress oxydant, les hépatocytes sont traités pendant 24h avec les échantillons de pommes et de carottes. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 1h avec l'agent pro-oxydant H₂O₂ 0,1%.

Les pré-adipocytes sont stimulées 3 jours après confluence avec les différents échantillons de pommes et de carottes, et en présence ou non d'un cocktail de différenciation comprenant du milieu de croissance DMEM High Glucose 4,5% (Lonza) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau (Biowest), 1% de L-Glutamine et 1% de Streptomycine/Pénicilline (Lonza), de la dexaméthasone (DM, 1,250 µM), de l'isobutyl méthylxanthine (IBMX, 250 µM) et de l'insuline (250 nM) pendant 3 jours. Ensuite, le milieu est retiré et remplacé par du milieu complet en présence des échantillons et 100 nM d'insuline pendant 4 jours. Les échantillons végétaux sont testés sur les pré-adipocytes et les adipocytes.

À J+7, les adipocytes sont stimulées pendant 1h avec l'agent pro-oxydant H₂O₂ 1%

III. Détermination de la population apoptotique

Suite aux différents traitements, le milieu de culture contenant les cellules non-adhérentes est récupéré et les cellules adhérentes sont trypsinées, détachées, ajoutées au milieu de culture et centrifugées. Les cellules sont ensuite récupérées et fixées avec une solution éthanolique 70% à 4°C pendant au moins 4h. Les cellules sont mises en suspension avec une solution contenant 0,05mg/mL de RNase (Sigma-Aldrich) dilué dans du PBS pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, l'iodure de propidium à la concentration finale de 12,5 µg/mL est ajouté aux cellules en suspension pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules sont analysées par cytométrie en flux MACSQuant®.

IV. Stress Oxydant

Le stress oxydant est évalué en fonction de la fluorescence émise par une sonde, le dihydroéthidium (DHE) suite à son oxydation. Les adipocytes et les hépatocytes sontensemencées et adhérentes en plaque 96 puits. Les cellules sont traitées avec les échantillons en absence ou en présence du cocktail de différenciation et de l'acide

oléique pendant la durée de la phase de différenciation et pendant 24 heures, respectivement. Les cellules sont ensuite stimulées à l'aide de peroxyde d'hydrogène à 1% pour les adipocytes et 0,1% pour les hépatocytes pendant 1 heure. Le milieu contenant le peroxyde d'hydrogène est retiré. Le DHE (3 μ M) est déposé dans chaque puits pendant 1 heure à 37°C. Le PBS (Phosphate Buffered Saline) est ensuite ajouté dans chaque puits permettant ainsi la suspension cellulaire dans un volume final de 200 μ L. La fluorescence des cellules est ensuite analysée au cytomètre avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 575 nm.

V. Coloration et quantification des gouttelettes lipidiques au Red Oil au niveau des hépatocytes (HepG2) et des adipocytes (3T3-L1)

L'accumulation des lipides est quantifiée par la coloration et décoloration des gouttelettes lipidiques au Oil Red O. Cette extraction du Red Oil au niveau des gouttelettes lipidiques permet de quantifier par spectrophotométrie les effets des échantillons végétaux sur l'accumulation des lipides au niveau des adipocytes et des hépatocytes. La solution de Red Oil est préparée en diluant 12 mL de la solution stock (10g/L) avec 8 mL d'eau déionisée. Après la fixation des cellules au paraformaldéhyde 4%, celles-ci sont rincées avec du PBS1X et colorées au Red Oil pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite rincées au PBS1X et décolorées une première fois à l'isopropanol 60% pendant 30 minutes afin d'éliminer le Red Oil fixée sur les parois des puits et une seconde fois à l'isopropanol 100% pendant 30 minutes afin d'extraire le Red Oil des gouttelettes lipidiques.

Protocoles : Accumulation des lipides / Stress oxydant / Apoptose

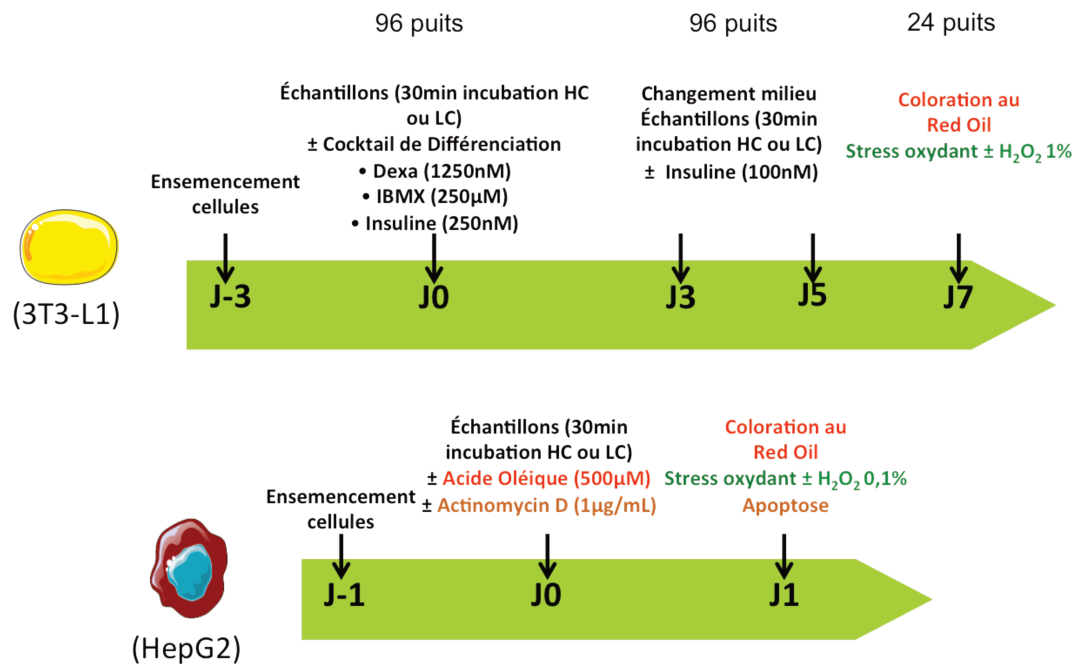


Figure 18) Schéma récapitulatif du protocole expérimental

VI. Interprétation des résultats

Les résultats obtenus seront décrits en fonction de critères établis au sein du laboratoire (Figure 19).

- Pré-adipocytes 3T3-L1

Chez les patients atteints d'obésité, les adipocytes saturés en lipides présentent une capacité de stockage réduite, induisant une accumulation ectopique au sein de différents organes. Cette baisse de la capacité de stockage est associée à une augmentation du stress oxydant. Les critères bénéfiques sélectionnés seront les suivants :

- une augmentation de la différenciation cellulaire en vue de limiter l'accumulation ectopique de lipides
- une diminution de stress oxydant

- Hépatocytes HepG2

Comme décrit précédemment, la saturation des adipocytes en lipides induit un dépôt ectopique, notamment au niveau du foie. Cette accumulation ectopique participe au développement de la stéatose hépatique, entraînant ainsi une production de radicaux libres et pouvant induire la mort cellulaire des hépatocytes.

Les critères de sélection seront les suivant :

- une diminution de l'accumulation des lipides
- une diminution du stress oxydant
- une diminution de l'apoptose

Les effets des échantillons testés seront considérés comme étant significatifs lorsqu'ils présentent un potentiel bénéfique ou délétère à 20%, comparativement à la condition contrôle.

Critères de sélection des échantillons d'intérêt




| | Adipocytes (3T3-L1)  | Hépatocytes (HepG2)  | Cellules endothéliales (HUVECs)  |
|---------------------------------|---|--|--|
| Différenciation | ↗ | | |
| Accumulation des lipides | ↗ | ↘ | |
| Apoptose | | ↘ | ↘ |
| Prolifération | | ↗ | ↗ |
| Stress oxydant | ↘ | ↘ | ↘ |

Figure 19) Critères de sélection des échantillons d'intérêt

Les lignes correspondent aux expériences à réaliser

Les colonnes indiquent les lignées cellulaires à étudier.

Les flèches dirigées vers le haut indiquent une augmentation des effets recherchés.

Les flèches dirigées vers le bas indiquent une diminution des effets recherchés.

Les résultats obtenus seront visualisés sous forme de nuages de points. Les résultats en abscisse représentent les échantillons solubilisés dans le DMSO tandis que les résultats en ordonnée représentent les échantillons solubilisés dans l'EtOH.

Les échantillons compris dans le rectangle sont considérés comme ayant des effets neutres.

La position du point par rapport aux axes déterminera également l'effet bénéfique ou délétère de l'échantillon (Figure 20).

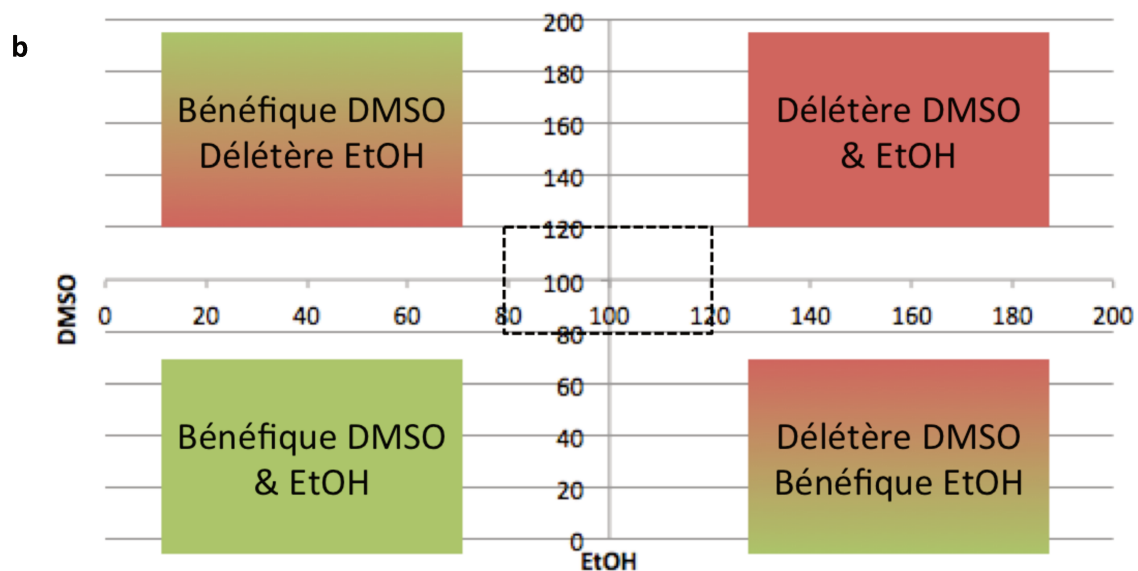
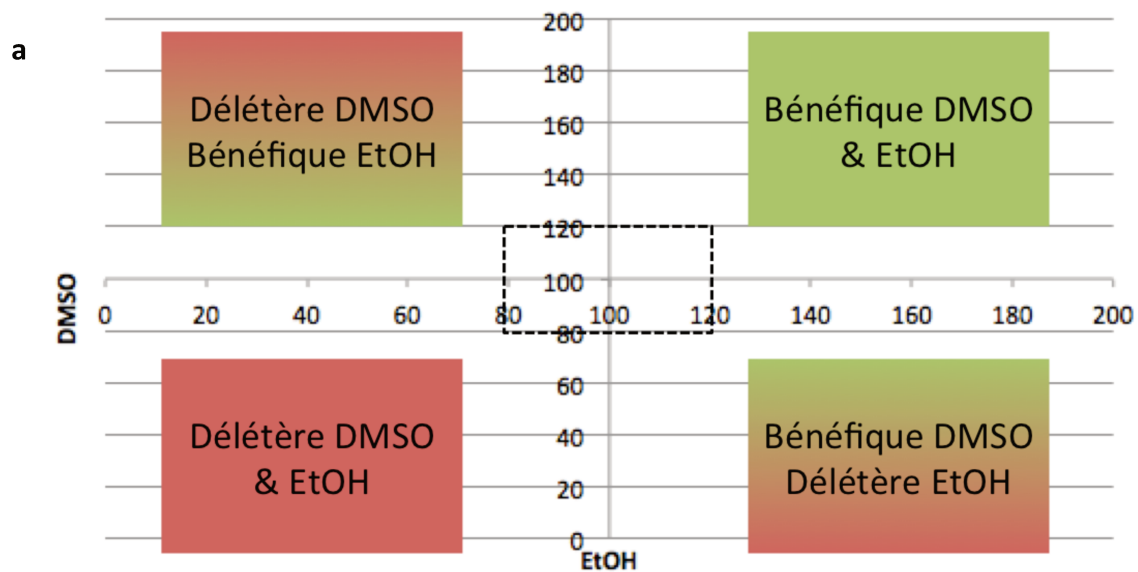


Figure 20) Indication des différentes zones

En fonction des résultats, les points indiqueront la caractéristique de l'échantillon en fonction de l'expérience et de l'effet recherché.

Figure a) Indication des zones lorsque l'effet recherché est une augmentation par rapport au contrôle

Figure b) Indication des zones lorsque l'effet recherché est une diminution par rapport au contrôle

RÉSULTATS

I. Effets des échantillons de pommes solubilisés dans le DMSO et l'EtOH

A. Stress oxydant au niveau des adipocytes

Suite à la solubilisation des échantillons dans le DMSO, les résultats obtenus indiquent que les variétés GS et PL en condition Atmosphère Contrôlée et XULO, respectivement, diminuent le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. Ces échantillons possèdent les potentiels anti-oxydants les plus intéressants avec une diminution de l'ordre de 24%. Les autres échantillons sont considérés comme ayant des effets neutres, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent ni de propriétés anti-oxydantes, ni de propriétés pro-oxydantes.

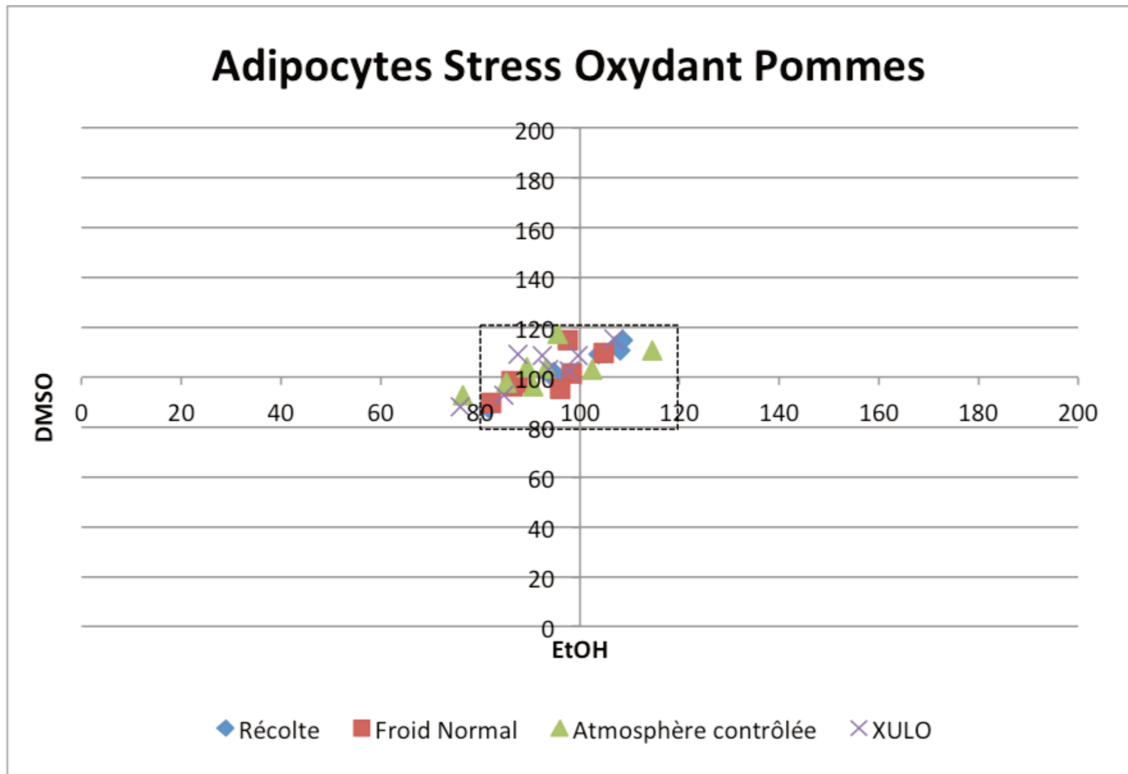
Concernant la solubilisation dans l'EtOH, aucun échantillon ne semble avoir d'effet sur le stress oxydant. En effet, les échantillons ne semblent pas potentialiser ou inhiber les effets du peroxyde d'hydrogène selon les critères établis lors du criblage. (Figure 21a)

B. Différenciation et accumulation des lipides au niveau des adipocytes

Dans le cas du DMSO, les variétés de pomme GA et GD en post-récolte semblent inhiber la différenciation adipocytaire avec une diminution maximale de l'ordre de 30% et 27%, respectivement. Au contraire, les variétés GD en condition Froid Normal et Atmosphère Contrôlée ont tendance à potentialiser la différenciation, avec un pic d'efficacité 26% pour la condition Atmosphère Contrôlée à faible concentration.

Dans le cas de l'EtOH, la condition post-récolte semble inhiber la différenciation adipocytaire et ce, indépendamment de la variété. En effet, les effets des échantillons culminent entre 23% pour l'échantillon PL à faible concentration et 39% pour l'échantillon GA à haute concentration. En revanche, les autres échantillons ne semblent pas avoir d'effets sur la différenciation adipocytaire. (Figure 21b)

a



b

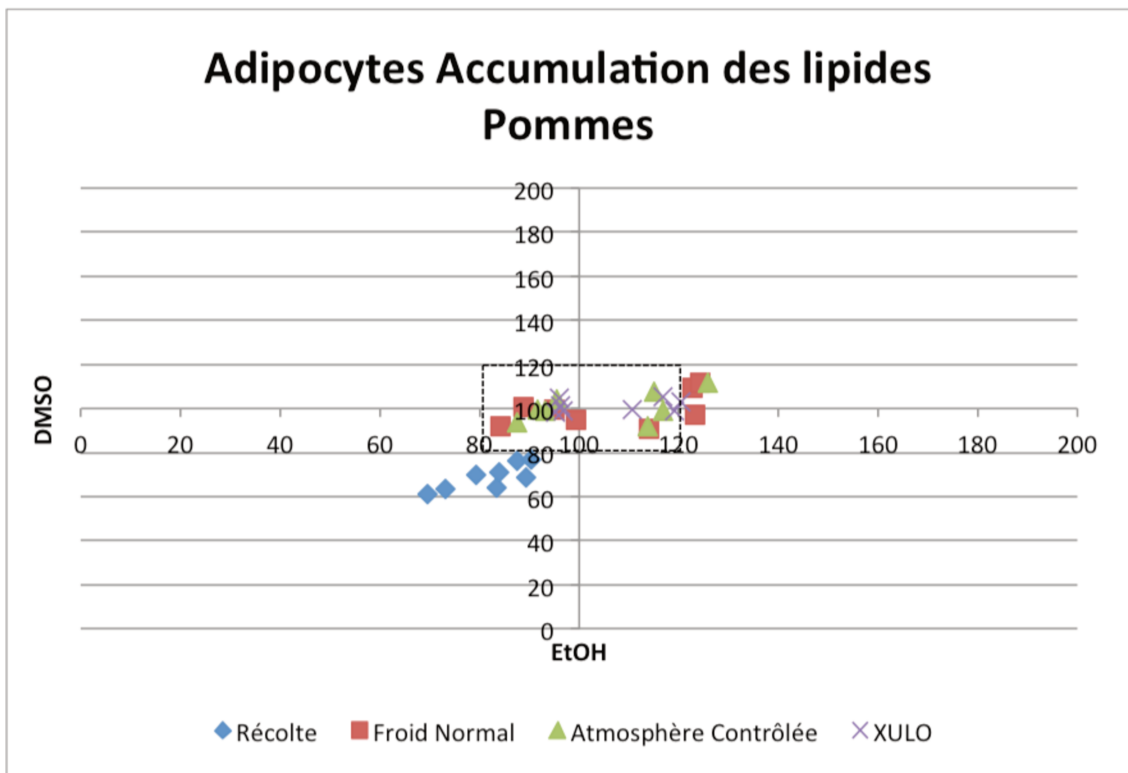


Figure 21) Effets des échantillons de pommes sur le stress et l'accumulation des lipides au niveau des adipocytes

Les résultats en abscisse représentent les échantillons solubilisés dans le DMSO tandis que les résultats en ordonnée représentent les échantillons solubilisés dans l'EtOH. Les échantillons compris dans le rectangle sont considérés comme ayant des effets neutres.

Les échantillons se trouvant à l'extérieur du rectangle sont considérés comme ayant un effet positif ou délétères en fonction de l'effet recherché. n=2

Figure a) Effets des échantillons sur le stress oxydant

Figure b) Effets des échantillons sur l'accumulation des lipides

C. Stress oxydant au niveau des hépatocytes

La majorité des échantillons PR solubilisés dans le DMSO induit une inhibition du stress oxydant, l'échantillon les plus efficaces étant les variétés GD et GS à haute concentration avec une diminution de 33%. Ces effets se retrouvent également avec les échantillons GD et PL en condition Froid Normal, avec une efficacité de 24% et de 22%, respectivement.

Ces effets sont sensiblement similaires lorsque les différents échantillons sont solubilisés dans l'EtOH. À haute concentration, les échantillons post-récolte ont la capacité d'inhiber le stress oxydant avec une efficacité pouvant aller de 36% pour la variété GS. En revanche, la majorité des échantillons ne semblent pas avoir d'effets sur le stress oxydant induit au niveau des hépatocytes. (Figure 22a)

D. Accumulation des lipides au niveau des hépatocytes

Lorsque les échantillons sont solubilisés dans le DMSO, aucun effet n'a été observé suite à la stimulation des hépatocytes avec les échantillons de pommes en condition PR excepté la variété PL à faible concentration avec une potentialisation des effets de 37%. À l'inverse, hormis les variétés GA et GS à faible concentration, les variétés conservés selon le mode Froid Normal ont tendance à accentuer l'accumulation des lipides induite par l'acide oléique. Dans cette catégorie, les échantillons ayant les plus grands effets sont la variété GD à haute concentration avec un effet de 110%, suivi du même échantillon mais à faible concentration avec un pourcentage d'effet de 53%. Concernant la condition AC, la variété GS semble inhiber les effets de l'acide oléique, avec une diminution de l'accumulation des lipides d'environ 20%. En revanche, les échantillons GA et GD favorisent l'accumulation des lipides avec un pourcentage d'effet allant de 45% pour la variété GA jusqu'à 117% pour l'échantillon GD. Enfin, pour la condition XULO, les résultats observés sont sensiblement identiques que la condition AC.

Concernant les échantillons solubilisés dans l'EtOH, les échantillons de la condition post-récolte ne semblent pas intervenir sur l'accumulation des lipides induite par l'acide oléique. Ensuite, l'échantillon GD en froid normal potentialise les effets de

l'acide oléique avec une augmentation des effets allant de 76% à 20% pour la haute et faible concentration, respectivement. Ces effets se retrouvent également au niveau de la condition AC avec un pourcentage d'augmentation de 75% et 46% pour la haute et la faible concentration. Enfin, les échantillons GA et GD en condition XULO favorisent le dépôt lipidique avec une augmentation de 21% pour la variété GA à haute concentration et une augmentation de 50% pour la variété GD, indépendamment de la concentration. (Figure 22b)

E. Apoptose au niveau des hépatocytes

Les variétés GA et PL, en condition PR, solubilisés dans le DMSO semblent inhiber l'apoptose induite par l'actinomycine D avec un pourcentage d'efficacité de 22% en haute concentration et 34% en faible concentration pour la GA. Concernant la variété PL, l'efficacité est de 34% et 32% pour la haute et la faible concentration, respectivement. La majorité des échantillons restants ne semble avoir aucun effet. Dans le cas des échantillons solubilisés dans l'EtOH, seule la variété PL en condition PR inhibe l'apoptose, l'efficacité anti-apoptique s'évaluant à 33% pour la haute concentration et 44% pour la faible concentration. Paradoxalement, la même variété conservée selon les 3 modes de conservation différents potentialise les effets de l'actinomycine D, avec un effet maximum de 82% pour la condition FN à faible concentration. (Figure 22c)

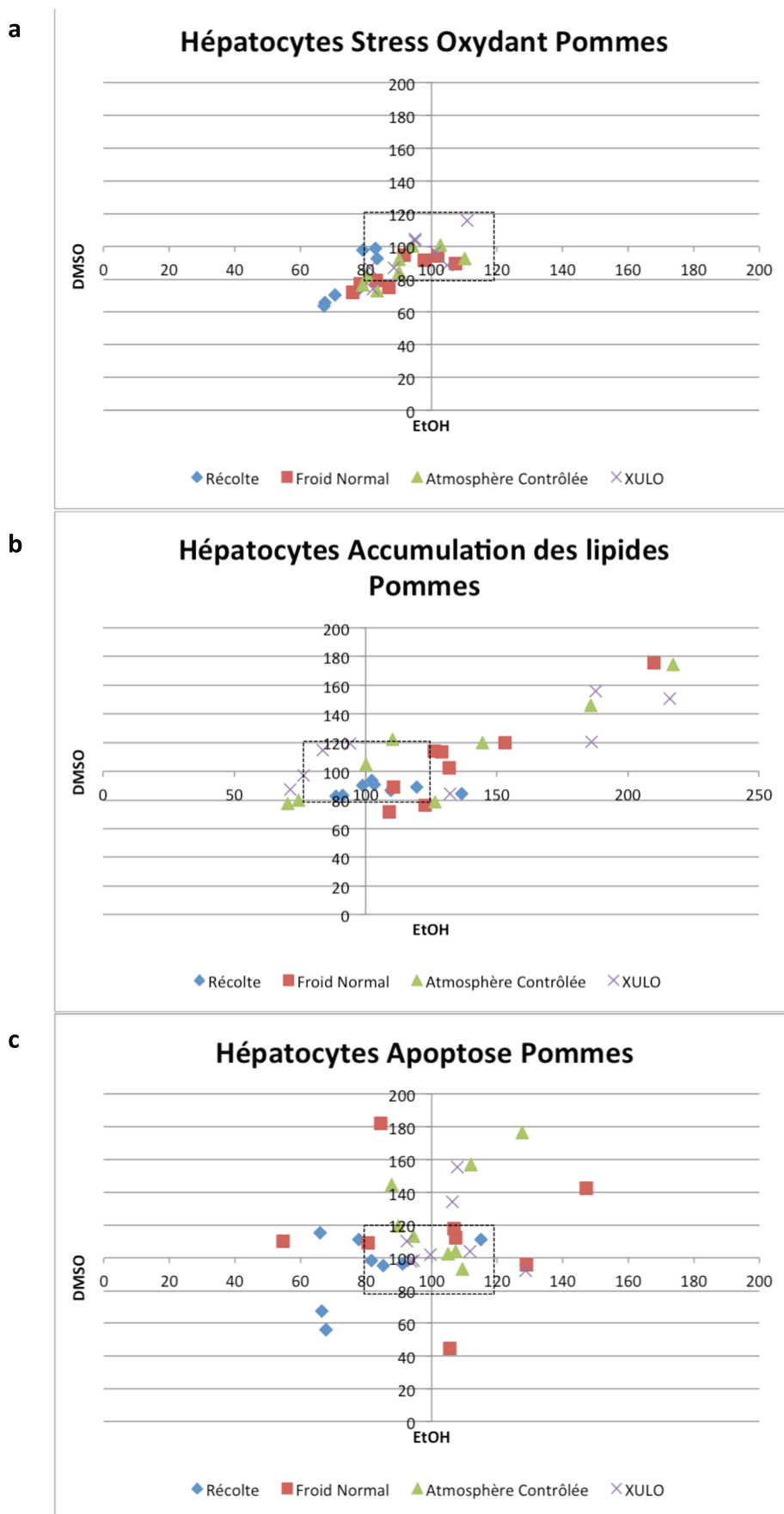


Figure 22) Effets des échantillons de pommes sur le stress oxydant, de l'accumulation des lipides et de l'apoptose au niveau des hépatocytes

Les résultats en abscisse représentent les échantillons solubilisés dans le DMSO tandis que les résultats en ordonnée représentent les échantillons solubilisés dans l'EtOH.

Les échantillons compris dans le rectangle sont considérés comme ayant des effets neutres.

Les échantillons se trouvant à l'extérieur du rectangle sont considérés comme ayant un effet positif ou délétère en fonction de l'effet recherché. n=2

Figure a) Effets des échantillons sur le stress oxydant

Figure b) Effets des échantillons sur l'accumulation des lipides

Figure c) Effets des échantillons sur l'apoptose

II. Effets des échantillons de carottes solubilisés dans le DMSO et l'EtOH

A. Stress oxydant au niveau des adipocytes

La variété KA, utilisée à haute concentration et en condition contrôle solubilisée dans le DMSO, accentue le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. En effet, le niveau de stress oxydant observé est augmenté de 35% comparé à la condition contrôle. Ensuite, la variété BV à faible concentration semble également diminuer le stress oxydant et ce, indépendamment de la condition de culture. Le pic d'efficacité concerne la condition SH avec une diminution du stress de 37%. Enfin, concernant les autres variétés, seule la condition A à haute concentration inhibe le stress oxydant, avec une diminution de 29%, 27% et 23% pour les variétés BO, PR et DP. La variété KI ne semble pas avoir d'effet sur le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène.

Lorsqu'elles sont solubilisées dans l'EtOH, les variétés KA, BO, PR et BV en condition A inhibent le stress oxydant de 25%, 25%, 27 et 35%, respectivement. À l'inverse, la condition SH semble potentialiser le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène et ce, pour toutes les variétés, allant de 21% d'effet délétère pour la variété DP jusqu'à 41% pour la variété BO. (Figure 23a)

B. Différenciation et accumulation des lipides au niveau des adipocytes

Les variétés KA et BO solubilisées dans le DMSO ne démontrent aucun effet sur la différenciation adipocytaire. En revanche, les échantillons PR et DP semblent améliorer la différenciation adipocytaire avec un effet supérieur à 20% et 22%, respectivement, comparé à la condition contrôle. Concernant les variétés KI et DP, les conditions SH et A accentuent cette différenciation, avec un pic maximal d'effet de 71% pour la variété BV avec la condition A.

Dans le cas de l'EtOH, deux variétés semblent améliorer la différenciation adipocytaire : la KI et la BV. Pour la 1^{ère} variété citée, seule la condition A et à haute concentration semble efficace, à hauteur de 52%. En revanche pour la variété BV, la potentialisation des effets se retrouve lorsque les carottes ont été cultivées selon les

modes de conservations SH et A. Ces effets sont plus importants pour la condition A avec une augmentation maximale des effets de 74%. (Figure 23b)

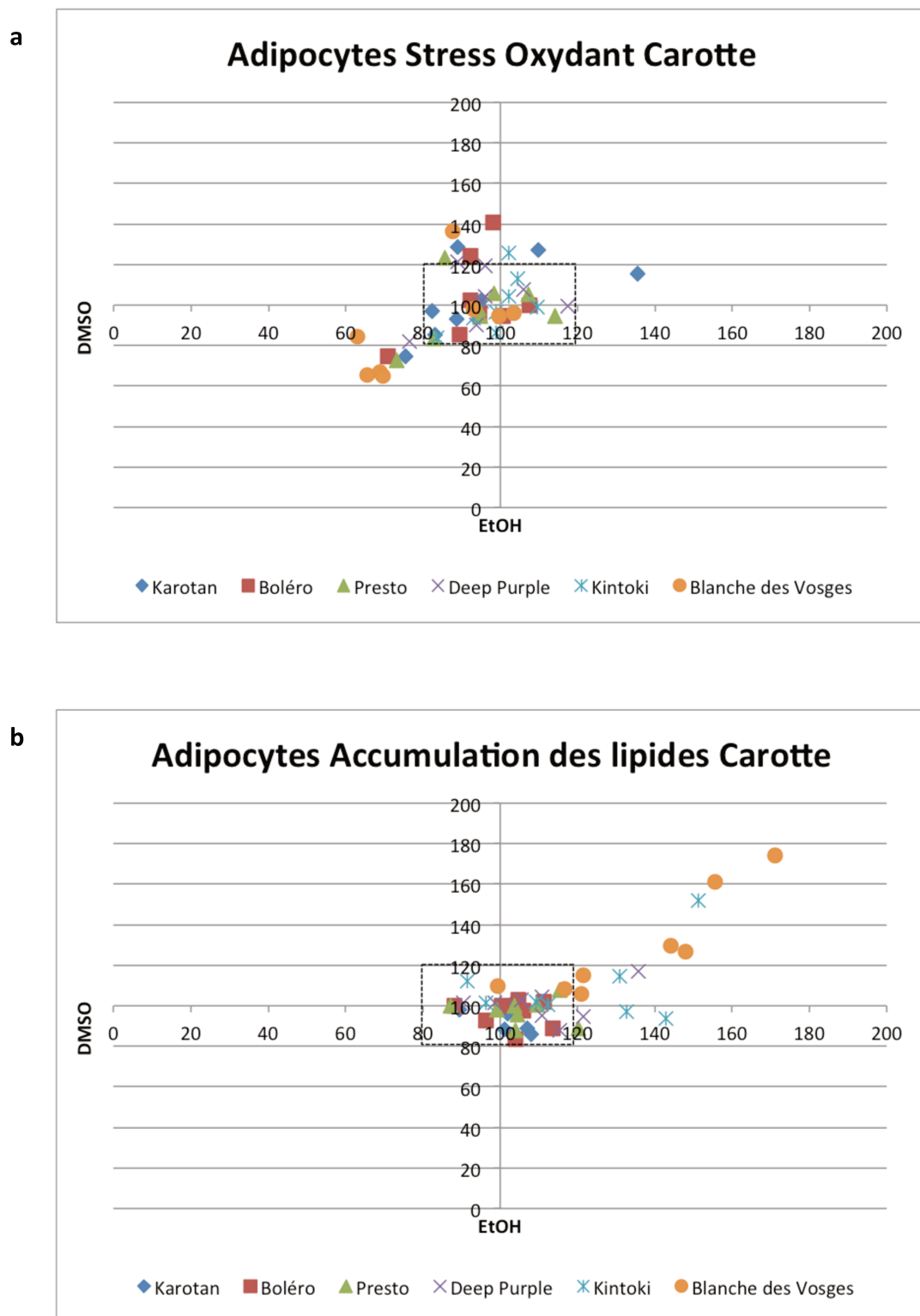


Figure 23) Effets des échantillons de carottes sur le stress et l'accumulation des lipides au niveau des adipocytes

Les résultats en abscisse représentent les échantillons solubilisés dans le DMSO tandis que les résultats en ordonnée représentent les échantillons solubilisés dans l'EtOH. Les échantillons compris dans le rectangle sont considérés comme ayant des effets neutres.

Les échantillons se trouvant à l'extérieur du rectangle sont considérés comme ayant un effet positif ou délétères en fonction de l'effet recherché. n=2

Figure a) Effets des échantillons sur le stress oxydant

C. Stress oxydant au niveau des hépatocytes

Les échantillons des différentes variétés solubilisés dans le DMSO, en condition de stress hydrique, diminuent le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. Les variétés BO, PR et BV semblent également diminuer le stress oxydant, indépendamment des conditions de culture. Les effets les plus significatifs se retrouvent sur la variété BO en condition A et la variété DP en condition C avec chacun un effet anti-oxydant de 30%. Cependant, des effets pro-oxydants se retrouvent au niveau de certains échantillons, notamment les variétés DP et KI en conditions de stress croisés avec des effets oxydants allant de 26% pour la 1ere variété et 30% pour la seconde.

Concernant les échantillons solubilisés dans l'EtOH, l'ensemble des variétés en condition contrôle semble diminuer le stress. À ce niveau, l'échantillon le plus intéressant se trouve être la variété KA avec un effet anti-oxydant de 38%. Les mêmes sont retrouvés pour la condition stress biotique, excepté la variété KI. En revanche, deux échantillons induisent un effet pro-oxydant, à savoir les variétés KI en condition de stress biotique et BV en condition de stress croisés, avec des effets de l'ordre de 32% et 20%, respectivement. (Figure 24a)

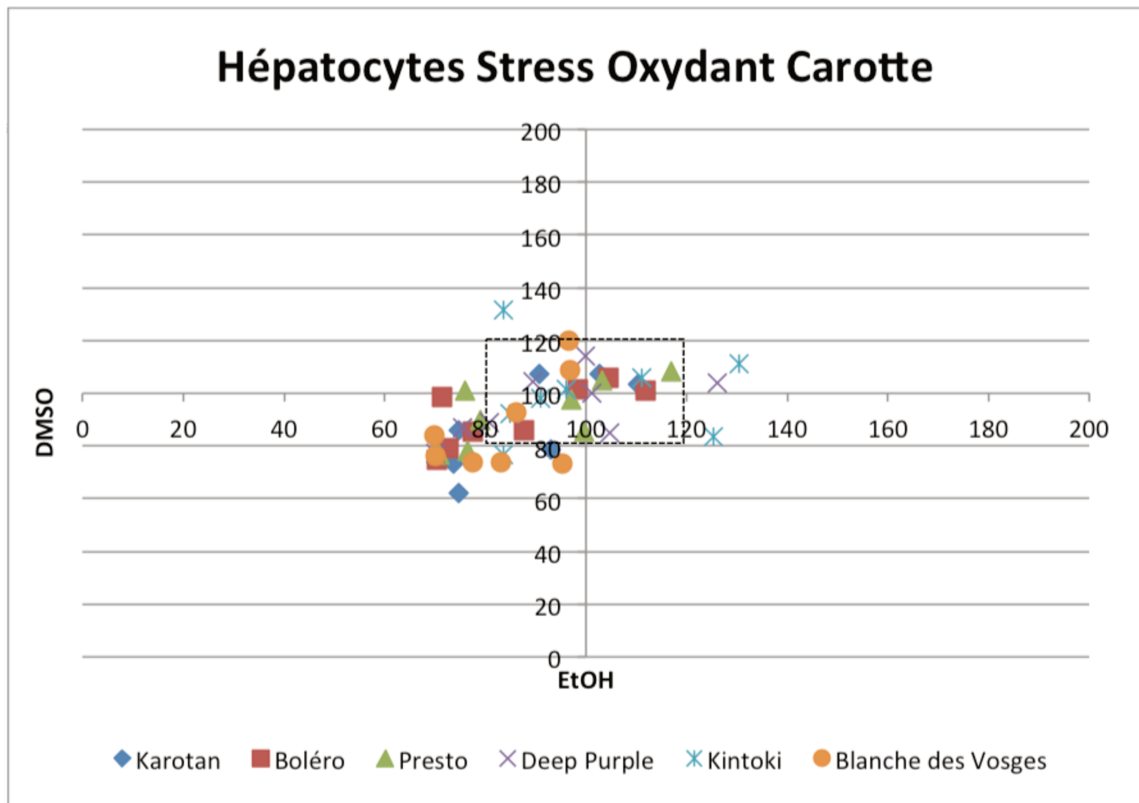
D. Accumulation des lipides au niveau des hépatocytes

Dans le cas des échantillons solubilisés dans le DMSO, excepté pour la variété KA, la condition de stress biotique semble être la plus efficace pour limiter le dépôt lipidique au niveau des hépatocytes avec un effet maximal observé pour la variété KI de 45%. Cependant, certains échantillons ont la capacité d'augmenter l'accumulation de lipides, dont notamment la variété KI en condition contrôle avec une augmentation de l'accumulation lipidique de l'ordre de 62%.

Les échantillons solubilisés dans l'EtOH et tous les échantillons issus de la condition de culture Stress Hydrique diminuent l'accumulation lipidique sauf la variété BV. LE reste des échantillons issus de la même culture semblent diminuer l'accumulation des lipides d'environ 20% à 25%. En revanche, les variétés KI et BV en condition

contrôle semblent favoriser le dépôt lipidique avec une augmentation observée maximale de 29% et 39%, respectivement. (Figure 24b).

a



b

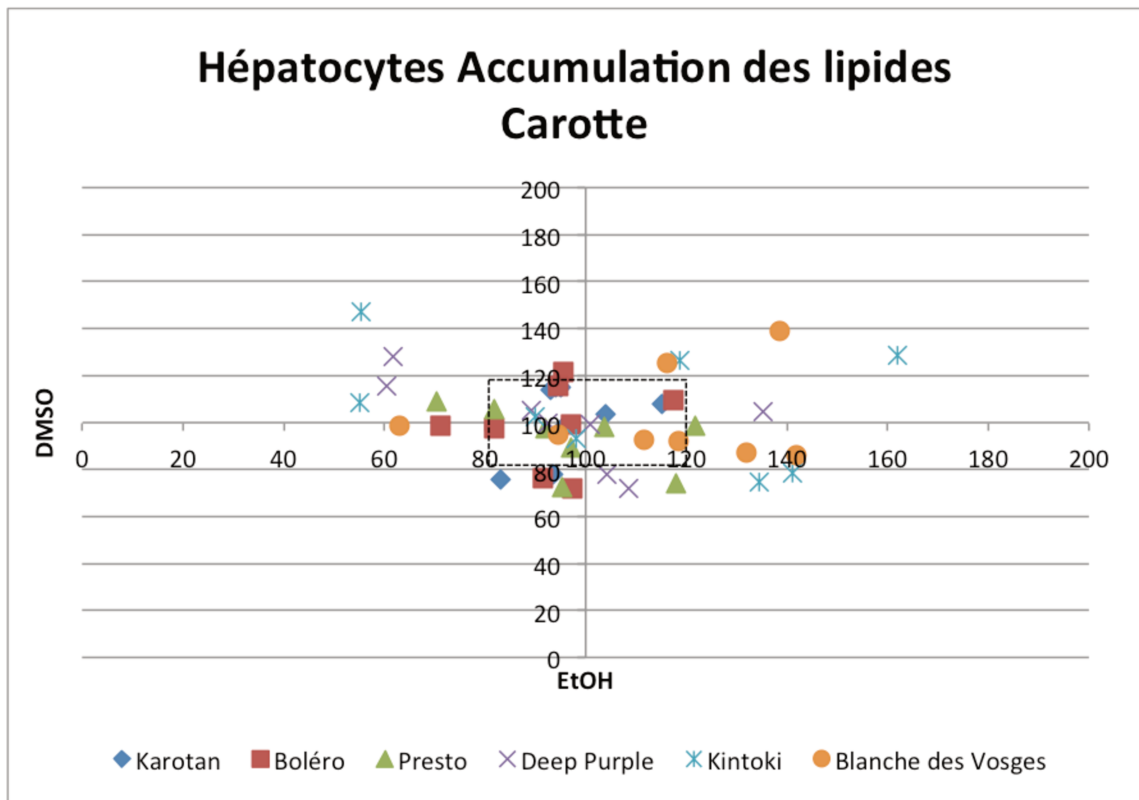


Figure 24) Effets des échantillons de carottes sur le stress et l'accumulation des lipides au niveau des hépatocytes

Les résultats en abscisse représentent les échantillons solubilisés dans le DMSO tandis que les résultats en ordonnée représentent les échantillons solubilisés dans l'EtOH. Les échantillons compris dans le rectangle sont considérés comme ayant des effets neutres.

Les échantillons se trouvant à l'extérieur du rectangle sont considérés comme ayant un effet positif ou délétères en fonction de l'effet recherché. n=2

Figure a) Effets des échantillons sur le stress oxydant

Les résultats peuvent aussi être présentés sous format « heat-map ». Les tableaux présentés regroupent les différents résultats obtenus en fonction du solvant, des expériences et des échantillons testés. Les cases vertes représenteront les effets bénéfiques tandis que les cases rouges représenteront les effets délétères. Les lignes correspondent à l'impact de la conservation des échantillons à une concentration donnée. Les colonnes quant à elles correspondent aux différentes expérimentations réalisées sur les lignées cellulaires. Ces tableaux permettent de mieux visualiser les échantillons possédant le plus de critères bénéfiques et de critères délétères. (Tableaux 2-5).

Tableau 2) Tableau récapitulatif regroupant les résultats obtenus lors des expérimentations réalisées au sein du laboratoire. Les échantillons sont répartis en lignes (PR : Post-Récolte, FN : Froid Normalisé, AC : Atmosphère Contrôlée, XO : X-Ultra Low Oxygen, GA : Gala, GD : Golden Delicious, GS : Granny Smith, PL : Pink Lady, HC : Haute Concentration, LC : Faible Concentration). Les expérimentations sont réparties en colonnes (AL : Accumulation des Lipides, Apop : Apoptose, SO : Stress Oxydant). Les cases vertes correspondent aux effets bénéfiques des échantillons testés sur une lignée cellulaire et une expérience déterminées. Les cases rouges correspondent aux effets délétères et les cases blanches correspondent aux effets neutres. Les critères bénéfiques sont ensuite additionnés d'une part, et les critères délétères d'autre part. Échantillons solubilisés dans le DMSO, En rouge est encadré l'échantillon possédant le plus de critères bénéfiques n=2

| Echantillons | | | 3T3-L1 | | HepG2 | | | Critères bénéfiques | Critère délétères |
|--------------|----|----|--------|----|-------|----|------|---------------------|-------------------|
| | | | SO | AL | SO | AL | Apop | | |
| PR | GA | HC | | | | | 2 | 1 | |
| | | LC | | | | | 1 | 1 | |
| | GD | HC | | | | | 1 | 1 | |
| | | LC | | | | | 0 | 0 | |
| | GS | HC | | | | | 1 | 0 | |
| | | LC | | | | | 1 | 0 | |
| | PL | HC | | | | 2 | 0 | | |
| FN | GA | HC | | | | | 0 | 1 | |
| | | LC | | | | | 0 | 0 | |
| | GD | HC | | | | | 2 | 2 | |
| | | LC | | | | | 1 | 1 | |
| | GS | HC | | | | | 0 | 1 | |
| | | LC | | | | | 1 | 0 | |
| PL | HC | | | | | 1 | 2 | | |
| | LC | | | | | 1 | 1 | | |
| AC | GA | HC | | | | | 0 | 1 | |
| | | LC | | | | | 0 | 1 | |
| | GD | HC | | | | | 1 | 1 | |
| | | LC | | | | | 1 | 1 | |
| | GS | HC | | | | | 2 | 0 | |
| | | LC | | | | | 1 | 0 | |
| PL | HC | | | | | 0 | 0 | | |
| | LC | | | | | 0 | 1 | | |
| XO | GA | HC | | | | | 0 | 1 | |
| | | LC | | | | | 0 | 2 | |
| | GD | HC | | | | | 0 | 1 | |
| | | LC | | | | | 1 | 1 | |
| | GS | HC | | | | | 1 | 0 | |
| | | LC | | | | | 1 | 0 | |
| PL | HC | | | | | 1 | 0 | | |
| | LC | | | | | 0 | 0 | | |

Tableau 3) Tableau récapitulatif regroupant les résultats obtenus lors des expérimentations réalisées au sein du laboratoire. Les échantillons sont répartis en lignes (PR : Post-Récolte, FN : Froid Normalisé, AC : Atmosphère Contrôlée, XO : X-Ultra Low Oxygen, GA : Gala, GD : Golden Delicious, GS : Granny Smith, PL: Pink Lady, HC: Haute Concentration, LC: Faible Concentration). Les expérimentations sont réparties en colonnes (AL : Accumulation des Lipides, Apop : Apoptose, SO : Stress Oxydant). Les cases vertes correspondent aux effets bénéfiques des échantillons testés sur une lignée cellulaire et une expérience déterminées. Les cases rouges correspondent aux effets délétères et les cases blanches correspondent aux effets neutres. Les critères bénéfiques sont ensuite additionnés d'une part, et les critères délétères d'autre part. Échantillons solubilisés dans l'EtOH, En rouge est encadré l'échantillon possédant le plus de critères bénéfiques n=2

| Echantillons | | | 3T3-L1 | | HepG2 | | | Critères bénéfiques | Critère délétères |
|--------------|----|----|--------|----|-------|----|------|---------------------|-------------------|
| | | | SO | AL | SO | AL | Apop | | |
| PR | GA | HC | | | ■ | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | | 0 | 1 |
| | GD | HC | | | ■ | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | | 0 | 1 |
| | GS | HC | | | ■ | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | | 0 | 1 |
| | PL | HC | | | ■ | | ■ | 2 | 1 |
| | | LC | | | | | | 1 | 1 |
| | GA | HC | | | ■ | ■ | 2 | 0 | |
| FN | GA | LC | | | | | 0 | 0 | |
| | | HC | | | ■ | | | 1 | 1 |
| | GD | LC | | | | ■ | | 0 | 1 |
| | | HC | | | ■ | | ■ | 2 | 0 |
| | PL | HC | | | ■ | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | ■ | 0 | 1 |
| AC | GA | HC | | | ■ | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | ■ | | 1 | 0 |
| | GD | HC | | | ■ | | ■ | 1 | 1 |
| | | LC | | | | ■ | | 0 | 1 |
| | GS | HC | | | | ■ | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | ■ | | 1 | 1 |
| | PL | HC | | | | | ■ | 0 | 1 |
| | | LC | | | ■ | | ■ | 0 | 2 |
| XO | GA | HC | | | ■ | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | | 0 | 0 |
| | GD | HC | | | | ■ | | 0 | 1 |
| | | LC | | | | ■ | | 0 | 1 |
| | GS | HC | | | | | | 0 | 0 |
| | | LC | | | | | | 0 | 0 |
| | PL | HC | | | | | ■ | 0 | 1 |
| | | LC | | | | | | 0 | 1 |

Grâce à l'élaboration de ces tableaux, les résultats montrent que les échantillons solubilisés dans le DMSO possédant les effets les plus intéressants sont les échantillons PR-PL-HC et AC-GS-HC avec chacun deux critères bénéfiques et sans aucun critère délétère. Concernant le solvant éthanolique, l'échantillon le plus intéressant est FN-AC-HC avec 2 critères bénéfiques et aucun délétère.

Tableau 4) Tableau récapitulatif regroupant les résultats obtenus lors des expérimentations réalisées au sein du laboratoire. Les échantillons sont répartis en lignes (KA : Karotan, BO : Bolero, PR : Presto, DP : Deep Purple, KI : Kintoki, BV : Blanche des Vosges, C : Contrôle, SH : Stress Hydrique, SB : Stress Biotique, SC : Stress Croisés, HC : Haute Concentration, LC : Faible Concentration). Les expérimentations sont réparties en colonnes (AL : Accumulation des Lipides, Apop : Apoptose, SO : Stress Oxydant). Les cases vertes correspondent aux effets bénéfiques des échantillons testés sur une lignée cellulaire et une expérience déterminées. Les cases rouges correspondent aux effets délétères et les cases blanches correspondent aux effets neutres. Les critères bénéfiques sont ensuite additionnés d'une part, et les critères délétères d'autre part. Échantillons solubilisés dans le DMSO. En rouge est encadré l'échantillon possédant le plus de critères bénéfiques n=2

| Echantillons | | | 3T3 L1 | | HepG2 | | Critères bénéfiques | Critère délétères |
|--------------|----|----|--------|----|-------|----|---------------------|-------------------|
| | | | SO | AL | SO | AL | | |
| KA | C | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SH | HC | | | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SB | HC | | | | | 2 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| SC | HC | | | | | 0 | 0 | |
| | LC | | | | | 0 | 0 | |
| BO | C | HC | | | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SH | HC | | | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SB | HC | | | | | 3 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| SC | HC | | | | | 1 | 0 | |
| | LC | | | | | 0 | 0 | |
| PR | C | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SH | HC | | | | | 2 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SB | HC | | | | | 2 | 0 |
| | | LC | | | | | 1 | 0 |
| SC | HC | | | | | 1 | 0 | |
| | LC | | | | | 0 | 0 | |
| DP | C | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SH | HC | | | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | 0 | 0 |
| | SB | HC | | | | | 4 | 0 |
| | | LC | | | | | 1 | 0 |
| SC | HC | | | | | 0 | 0 | |
| | LC | | | | | 0 | 1 | |
| KI | C | HC | | | | | 0 | 1 |
| | | LC | | | | | 0 | 1 |
| | SH | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 1 | 1 |
| | SB | HC | | | | | 2 | 0 |
| | | LC | | | | | 2 | 0 |
| SC | HC | | | | | 0 | 0 | |
| | LC | | | | | 0 | 1 | |
| BV | C | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 2 | 0 |
| | SH | HC | | | | | 1 | 1 |
| | | LC | | | | | 3 | 1 |
| | SB | HC | | | | | 1 | 0 |
| | | LC | | | | | 3 | 0 |
| SC | HC | | | | | 1 | 0 | |
| | LC | | | | | 2 | 0 | |

Tableau 5) Tableau récapitulatif regroupant les résultats obtenus lors des expérimentations réalisées au sein du laboratoire. Les échantillons sont répartis en lignes (KA : Karotan, BO : Bolero, PR : Presto, DP : Deep Purple, KI : Kintoki, BV : Blanche des Vosges, C : Contrôle, SH : Stress Hydrique, SB : Stress Biotique, SC : Stress Croisés, HC : Haute Concentration, LC : Faible Concentration). Les expérimentations sont réparties en colonnes (AL : Accumulation des Lipides, Apop : Apoptose, SO : Stress Oxydant). Les cases vertes correspondent aux effets bénéfiques des échantillons testés sur une lignée cellulaire et une expérience déterminées. Les cases rouges correspondent aux effets délétères et les cases blanches correspondent aux effets neutres. Les critères bénéfiques sont ensuite additionnés d'une part, et les critères délétères d'autre part. Échantillons solubilisés dans l'EtOH. En rouge est encadré l'échantillon possédant le plus de critères bénéfiques n=2

| Echantillons | | | 3T3-L1 | | HepG2 | | Critères bénéfiques | Critère délétères |
|--------------|----|----|--------|----|-------|----|---------------------|-------------------|
| | | | SO | AL | SO | AL | | |
| KA | C | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 2 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| | LC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| BO | C | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 2 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 1 | |
| | LC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| PR | C | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 2 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| | LC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| DP | C | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 0 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 0 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| | LC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| KI | C | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 1 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 0 | 1 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| | LC | . | . | . | . | 0 | 0 | |
| BV | C | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | SH | HC | . | . | . | . | 1 | 1 |
| | | LC | . | . | . | . | 2 | 0 |
| | SB | HC | . | . | . | . | 1 | 0 |
| | | LC | . | . | . | . | 3 | 0 |
| SC | HC | . | . | . | . | 0 | 1 | |
| | LC | . | . | . | . | 2 | 0 | |

Les échantillons de carotte les plus intéressants, lorsque solubilisés dans le DMSO, sont les échantillons DP-SB-HC avec 4 critères bénéfiques pour aucun délétère, suivi des échantillons BO-SB-HC et BV-SB-LC avec 3 critères bénéfiques pour aucun délétère. Pour les résultats des échantillons solubilisés dans l'éthanol, le même échantillon BV-SB-LC est également l'échantillon le plus intéressant avec 3 critères bénéfiques et aucun délétère.

Les différentes méthodes de visualisation des résultats nous fournissent des données différentes. Le nuage de point permet d'évaluer l'efficacité des échantillons sur une expérience précise tandis que la « heat-map » permet de déterminer les échantillons possédant le plus de critères bénéfiques et délétères. Ces méthodes permettent, entre autres, de sélectionner les échantillons d'intérêt en fonction des expérimentations.

Le criblage a également été réalisé au niveau de deux autres modèles cellulaires : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les résultats issus de ces expérimentations ont également démontré des différences d'effets en fonction des variétés et des conditions de culture et de conservation.

Fort de ces résultats, nous allons maintenant pouvoir étudier les voies de signalisation impliquées dans les effets anti-apoptotiques observés au niveau des cellules endothéliales et ainsi répondre au second objectif de cette thèse. Lors du criblage, les deux échantillons de pommes ayant le plus haut potentiel anti-apoptotique sur les cellules endothéliales ont été choisis afin de déterminer leurs mécanismes d'actions. Ces échantillons sont la Golden en Froid Normal et la Granny Smith en Atmosphère Contrôlée.

ARTICLE

Apple extracts display anti-apoptotic effects on endothelial cells by stimulating reactive oxygen production

Mehdi Frifra¹, Raffaella Soleti¹, Patricia Mallegol¹, Gregory Hilairat¹, Catherine Dourguia¹, M. Carmen Martinez¹, Mathilde Orsel-Baldwin², Marie-Charlotte Guillou², Jean-Pierre Renou², Ramaroson Andriantsitohaina¹

¹INSERM UMR 1063, Stress oxydant et pathologies métaboliques, Angers, France;

²INRA, Angers, France

Correspondance to: R. Andriantsitohaina, INSERM UMR 1063, Stress oxydant et pathologies métaboliques, Institut de Biologie en Santé, 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France. email: ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr

Running title: Anti-apoptotic effects of apple extracts

Keywords: apoptosis, apple extracts, endothelial cells, nitric oxide, reactive oxygen species

Abstract

The alteration of the integrity of endothelium, leading to endothelial dysfunction or triggering apoptosis is linked to various cardiovascular pathologies such as atherosclerosis, thrombosis. It is well known that a high consumption of fruit and vegetables has commonly been associated with a reduction in the risk of cardiovascular diseases. Indeed, apples account for an important part of the fruit intake in Western countries and its consumption has been associated with a reduced risk of cardiovascular diseases. However, the mechanisms involved in cardiovascular protection are not completely elucidated. Therefore, this study investigated the effect of two apple extracts on endothelial cells. The effects of apple extracts at concentration of 10^{-2} g/L after 24 hours of exposure were investigated on human umbilical vein endothelial cells in absence or presence of actinomycin D (Act D), an apoptosis inductor. Evaluation of hypodiploid DNA was determined by flow cytometry. The fluorescent probe DHE was used to measure the intracellular generation of ROS. In another set of experiments, endothelial cells were preincubated in the absence or presence of the nonselective caspase inhibitor, z-vad.fmk, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) inhibitor, nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, xanthine oxidase inhibitor, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) inhibitor or the superoxide dismutase (SOD) mimetic in order to evaluate underlining mechanisms. Apple samples displayed cytoprotective effects against Act D-induced apoptosis. The involved mechanism was not sensitive to pan-caspases inhibitor, but sensitive to the inhibition of PI3-kinase and NOS pathways. Moreover, ROS production from cytosolic and mitochondrial sources was obligatory for the protective effects of apple samples. Therefore, apple samples display an anti-apoptotic capacity on endothelial cells due to a concomitant activation of PI3K/NO cascade and ROS generation, confirming a protective effect against endothelial injuries.

Introduction

Atherosclerosis is a cardiovascular disease consisting of fat accumulation and lipid core formation in arteries. Lipid core can then disrupt and lead to the formation of thrombus, causing myocardial infarcts. Under physiological conditions, endothelial cells can form new vessels *via* angiogenesis and they control the regulation of the blood-flow thanks to the production of several factors such as nitric oxide (NO), prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelin-1. However, during atherosclerosis, the balance of production of these molecules is altered favoring the production of vasoconstrictor factors and enhancing the generation of radical oxygen species (ROS). This leads to the alteration of the integrity of endothelial cells, leading to endothelial dysfunction or triggering apoptosis and then spread lipids in the circulation (Mason 2016).

Prevention appears to be essential in order to decrease cardiovascular outcome of metabolic perturbations, and nutraceutical tools can be an interesting approach. In fact, epidemiologic studies demonstrate the relation between the consumption of fruits and vegetables and the decrease of deaths (Ellingsen et al., 2008). Vegetal compounds such as polyphenols and carotenoids may be responsible of these observations. Many studies show the ability of these compounds to improve function of endothelial cells exposed to deleterious stimuli (Dayoub et al., 2013). However, the majority of studies focused on one type of polyphenol such as quercetin or resveratrol, and no studies focused on the effects of the global of the vegetal. In fact, it may be the synergy of all vegetal's compounds which could be responsible of the beneficial effects of vegetables on health.

The aim of this study was to evaluate the effects of apple extracts on endothelial apoptosis using actinomycin D (Act D) as apoptosis inductor. Two varieties of apple (Golden Delicious & Granny Smith) stored either in classic cold conditions (CC, 0.5°C), or under controlled atmosphere (CA, 0.5°C/2% O₂/2% CO₂) respectively, were selected resulting to a previous screening assay. This screening assay demonstrated that these samples had the highest anti-apoptotic effect on ActD-induced apoptosis.

Material & Methods

Sample Preparation

Apple samples were generously provided by « La Morinière » (Angers, France). Twenty milligrams of freeze-drying lyophilized apple were solubilized in 2 ml of DMSO. The samples were vortexed for 10 minutes at room temperature and protected from light. Then, the solutions were filtered and were freshly used.

Cell culture

Human umbilical veins endothelial cells (HUVEC) were provided by ATCC (Molsheim, France). HUVECs were cultured in EGM-2 medium BulletKit system (Lonza, Verviers, Belgium) consisting of endothelial basal medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF), insulin growth factor-1 (IGF-1), ascorbic acid, gentamicin sulfate amphotericin, hydrocortisone and heparin and maintained at 37 °C and 5% CO₂. HUVECs were used between passages 2-5. All experiments were carried out when the cells were at 80-90% confluence.

HUVECs were grown for 24 hours, treated for 30 minutes with apple samples (10⁻² g/L) and then, in the absence or presence of the proapoptotic agent Act D (1 µg/ml). The concentration of apple samples used in the present study was identical to that of red wine polyphenols able to inhibit endothelial cell apoptosis (Martin et al., 2003). In another set of experiments, HUVECs were preincubated in the absence or presence of the nonselective caspase inhibitor, z-vad.fmk (50 µM, Enzo Life Sciences International, Plymouth Meeting, PA), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k) inhibitor, LY294002 (10 µM, Calbiochem, Darmstadt, Germany), nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, N^ω-nitro-L-arginine (L-NA) (100 µM, Sigma Aldrich), xanthine oxidase inhibitor, allopurinol (50 µM, Sigma Aldrich), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) inhibitor, apocynin (100 µM, Calbiochem), or the superoxide dismutase (SOD) mimetic, manganese(III)tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-

porphyrin pentachloride (MnTMPyP, 100 mM, Calbiochem).

Determination of hypodiploid DNA

After treatments, culture medium was removed, and adherent cells were trypsinized, detached, combined with floating cells from the original culture medium, and centrifuged. Cells were then fixed in 70 % ethanol for at least 4 hours at 4°C and suspended for 10 minutes in a solution containing type I-A RNase A (0.05 mg/mL, Sigma Aldrich) in PBS at 37 °C. Propidium iodide (PI, Sigma Aldrich) was then added at a final concentration of 12.5 µg/mL. After 15 min in the dark at room temperature, samples were analyzed by by MACSQuant® Flow Cytometers (Miltenyi Biotec).

Western blot

After treatment, cells were homogenized and lysed. Proteins (15 µg) were separated on 4-12% NuPage gels (Invitrogen, Carlsbad, CA). Blots were probed with antibodies against cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Bax, Bcl-2, and cytochrome c (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A polyclonal mouse anti-human β-actin antibody (Sigma-Aldrich) was used for standardization of protein gel loading. The membranes were then washed at least three times in Tris buffer solution containing 0.05% Tween and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). The protein–antibody complexes were detected by the ECL-Plus chemiluminescence kit (Amersham Biosciences) according to the protocol of manufacturer.

ROS determination

The fluorescent probe DHE was used to measure the intracellular generation of ROS. Briefly, 10×10^3 HUVECs per well were seeded into 96-well plates and allowed to attach overnight. Then cells were treated with 10^{-2} g/L of apple extracts for 24h in presence or absence of ActD (1µg/mL). After treatments, cells were incubated in 3µM DHE for 1h at 37°C. The fluorescence intensities of DHE were measured by

MACSQuant® Flow Cytometers (Miltenyi Biotec).

Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SEM; n represents the number of experiments repeated at least in triplicate. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney U-tests (non-parametric). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Apple samples prevent Act D-induced apoptosis by a caspase-independent mechanism

Evaluation of nuclei with hypodiploid DNA by flow cytometry shows that basal apoptosis measured in the presence of vehicle never exceed $12 \pm 2\%$. Whereas Golden Delicious CC did not modify basal apoptosis, Granny Smith CA reduced it (Figure 1A). Treatment of HUVECs with Act D induced an increase (3-fold) in the percentage of propidium iodide staining, reflecting the apoptotic population. To elucidate the effect of apple samples on the apoptotic process, we analyzed their effects in Act D-treated HUVECs for 24 hours. Apple samples were partially able to reduce the cell death observed upon 24 hours treatment of HUVECs with Act D (Figures 1B). The values of inhibition of apoptosis were 24.7 and 23% for Golden Delicious CC and Granny Smith CA samples, respectively. These results suggest that both apple samples have cytoprotective effects against Act D-induced apoptosis.

Next, we evaluated whether caspases were implicated in Act D-induced apoptosis, by testing the effect of the nonselective caspase inhibitor, z-vad.fmk. This inhibitor abolished the degree of apoptosis evoked by Act D, either in the presence or absence of apple samples. Since under these conditions it is not possible to determine the plausible involvement of caspase in the effects of apple samples, we analyzed their ability to modify caspase-3 cleavage by Western blot. As shown in Figure 1C, Act D increased caspase-3 cleavage (19 and 17 kDa forms), but both apple samples did not modify this cleavage (what do you conclude then? Also, neither Golden Delicious CC nor Granny Smith CA modified Bax-2, Bcl-2 and cytochrome c expression in the presence of Act D, suggesting that mitochondria are not involved in

the effects of apple samples.

Antiapoptotic effect of apple samples is mediated by a mechanism sensitive to pharmacological inhibitor of PI3-kinase and NO synthase

Activation of the PI3-kinase/NO pathway has been implicated in the protective effects of Red Wine Polyphenols Compounds on endothelial cells (Martin et al., 2003; Kim et al., 2016). To evaluate whether the PI3-kinase/NO cascade is involved in the protection exerted by apple samples against apoptosis, cells were incubated with PI3-kinase inhibitor, LY294002 (10 μ M) or the nonselective NOS inhibitor, L-NA (100 μ M), prior to addition of Act D. LY294002 or L-NA alone did not modify basal apoptosis. Moreover, both inhibitors, LY294002 or L-NA, did not modify apoptosis induced by Act D (Figure 2A, 2B). Interestingly, the ability of GD CC and GS CA to inhibit apoptosis induced by Act D was completely abrogated in the presence of either LY294002 or L-NA. These results suggest that the anti-apoptotic effect of GD CC and GS CA is sensitive to the inhibition of PI3-kinase and NOS pathways.

Prevention of Act D-evoked endothelial cell apoptosis by apple samples is MnTMPyP-sensitive

Contradictory data concerning the role of ROS generation on apoptosis are described. To test the hypothesis that ROS production participates in the effects of apple samples on apoptosis, endothelial cells were treated with the SOD mimetic, MnTMPyP (100 μ M), alone or in combination with apple samples in the absence or presence of Act D. MnTMPyP alone did not statistically modify basal apoptosis. Also, the effects of apple samples in the absence of Act D were not modified when cells were treated with MnTMPyP (not shown). Further, MnTMPyP did not modify apoptosis induced by Act D. However, the SOD mimetic abolished the anti-apoptotic effects of both apple samples (Figure 3A). These results suggest that ROS production is obligatory for the protective effects of apple samples.

Next, the analysis of ROS levels using dihydroetidium (DHE) labeling showed that neither Act D nor apple samples had effect on ROS production at 24 hours (Figure 3B). Interestingly, simultaneous treatment with MnTMPyP and ActD significantly reduced DHE labeling in all conditions. These compounds seem to act in a

synergetic way.

The anti-apoptotic effects of apple samples involve a mechanism sensitive to inhibitors of xanthine oxidase, NADPH oxidase and respiratory chain complex 1 of the mitochondria

To determine the possible involvement of oxidative stress in the effects of apple samples, endothelial cells were incubated with various inhibitors the sources of ROS prior to Act D stimulation. Indeed, intracellular enzymatic systems with the capacity to generate ROS were inhibited by allopurinol, apocynin or rotenone, which are inhibitors of xanthine oxidase, NADPH oxidase and respiratory chain complex I, respectively. At 24 hours of treatment, none of the inhibitors of cytosolic ROS modified the basal apoptosis in the absence of Act D (Figure 4A, 4B). By contrast, rotenone induced an increase of basal apoptosis (Figure 4C). Moreover, although all the inhibitors did not modify Act D-evoked apoptosis, they abolished the ability of apple samples to reduce Act D induced apoptosis. These results suggest that apple sample-induced ROS production from different sources is required for their anti-apoptotic effects (Figure 4A-4C).

Discussion

The data reported here show that apple samples display protective effects against endothelial cell apoptosis characterized by a decrease of hypodiploid DNA content as demonstrated by PI labeling. Interestingly, anti-apoptotic effects of apple samples were independent of caspase-3 inhibition. In addition, the effects of apple samples on apoptosis implicate activation of PI3-kinase/NO cascade as well as ROS production from cytosolic and mitochondrial sources.

It has previously shown that protection of endothelial cells against apoptosis by natural dietary compounds leads to beneficial effects against cardiovascular diseases. Thus, treatment with delphinidin, an anthocyanin present in natural diet, induced a reduction of both oxysterol and actinomycin D toxicity on endothelial cells

by the increase of eNOS and by maintaining the concentration of Ca^{2+} in the physiological range (Martin et al., 2003). Here, we showed that both Golden Delicious and Granny Smith were able to reduce apoptosis by 21.3% and 22.7% respectively. Interestingly, although the pan-caspase inhibitor, z-vad, blocked apoptosis induced by Act D, the effects of apple samples were not associated with reduction of caspase cleavage. These results suggest that the mechanism involved in the effects of apple samples is related to a caspase-independent pathway. Caspase-independent cell death is described as death that ensues when a signal that normally induces apoptosis fails to activate caspases. In the absence of caspase activity, death signals lead to the homodimerization of Bak/Bax complex. This complex could lead to mitochondrial membrane's permeabilization *via* activation of Voltage-Dependent Anion Channel. Then mitochondrial intermembrane space proteins are released in the cytosol such as AIF and EndoG. These proteins locate in the nucleus in order to degrade DNA (Tait & Green, 2008). Cells undergoing caspase-independent cell death often display large-scale cytoplasmic vacuolization, autophagosome accumulation and peripheral nuclear condensation (Tait & Green, 2008). Further studies for analyzing endothelial cell morphology may help us to understand the mechanisms by which apple samples are able to decrease endothelial apoptosis.

Therefore, since PI3K pathway is implicated in NOS activation and in NO release (Klinge et al., 2008), we explored the involvement of these cascades in the antiapoptotic effect of apple samples. Our data show that pretreatment of HUVECs with inhibitors of PI3K or NOS, LY294002 and L-NA, respectively, abolished the antiapoptotic effects of apple samples. These results indicate that, in the present study, the cytoprotective effect of these extracts on human endothelial cells was totally attributed to the NO pathway.

The beneficial cellular role of ROS is now being demonstrated in different fields, including intracellular signaling and redox regulation. It is well documented that low levels of ROS are signaling molecules, modulating cell proliferation, and gene expression through activation of transcription factors (for review see Poljsak et al. (2013). This is comforted by the fact that administration of antioxidants prevents health-promoting effects of physical exercise in humans (Ristow et al., 2009) suggesting an essential role for exercise-induced ROS formation in promoting insulin

sensitivity. Also, Meilhac et al (2001) have reported that plasma oxidative stress induced by the exercise could be responsible for the prevention of atherosclerosis by stimulating arterial antioxidant response. Here, we have observed that scavenging of ROS by MnTMPyP abolished the anti-apoptotic effects of apple samples. Also, inhibition of cytosolic and mitochondrial ROS sources completely prevented the beneficial effects of apple samples. However, we were not able to detect any change on ROS levels at 24 hours of treatment. Several hypotheses could be advanced to explain these findings: Firstly, it is possible that ROS generation is released at low levels which may be below the threshold of detection by DHE staining. Secondly, it is plausible that ROS are increased at the early phase of apoptosis, as we have previously shown. ROS levels of cells treated with ActD significantly increased during the early phase of apoptosis (2 h), but near to basal values at 4, 8, and 24h (Soleti et al., 2012).

Further experiments are needed to determine whether ROS generation evoked by apple samples leads to the activation of NOS involved in the release of NO. If this is the case, we can postulate the same mechanism described by our group concerning the protective effects of polyphenols from red wine (Duarte et al., 2004). Interestingly, in bovine aortic endothelial cells, polyphenols from red wine increased ROS generation from NADPH oxidase (Duarte et al., 2004). This is agreement with the present study showing that the anti-apoptotic effects of apple samples were abolished when NADPH oxidase. In addition, other sources of ROS (from xanthine oxidase and from mitochondria) seem to be involved in the effects of apples. We cannot, however, exclude that apple extract-carried pro-oxidant enzymes (Shi et al., 2014) can increase ROS into endothelial cells.

In summary, we demonstrate that apple samples, independently of the variety, protect endothelial cells against apoptosis. Both PI3K/NO cascade and ROS generation account for these protective effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank “La Morinière” which kindly provided the apple samples for this study. This work was supported by Région Pays-de-la-Loire, INSERM, INRA, FruitQual team and Université d’Angers.

References

Dayoub O, Andriantsitohaina R, Clere N Pleiotropic beneficial effects of epigallocatechin gallate, quercetin and delphinidin on cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction.. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2013 Dec;11(4):249-64.

Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res.* 2004;53(6):595-602.

Ellingsen I, Hjerkin EM, Seljeflot I, Arnesen H, Tonstad S. Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men. *Br J Nutr.* 2008 Mar;99(3):674-81.

Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 22:2185–2197; 2008.

Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol.* 2003 Jul;139(6):1095-102.

Mason JC. Cytoprotective pathways in the vascular endothelium. Do they represent a viable therapeutic target? *Vascul Pharmacol.* 2016 Aug 9. pii: S1537-1891(16)30118-5. doi: 10.1016/j.vph.2016.08.002.

Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Oct;21(10):1681-8.

Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792. doi: 10.1155/2013/956792.

Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8665-70. doi: 10.1073/pnas.0903485106.

Shi Y, Jiang L, Zhang L, Kang R, Yu Z. Dynamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage. *Hortic Res*. 2014 Jan 22;1:6. doi: 10.1038/hortres.2014.6.

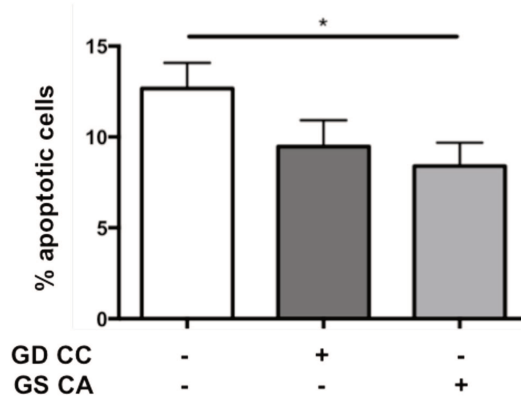
Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012 Dec 1;53(11):2159-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.021.

Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6452-61. doi: 10.1038/onc.2008.311.

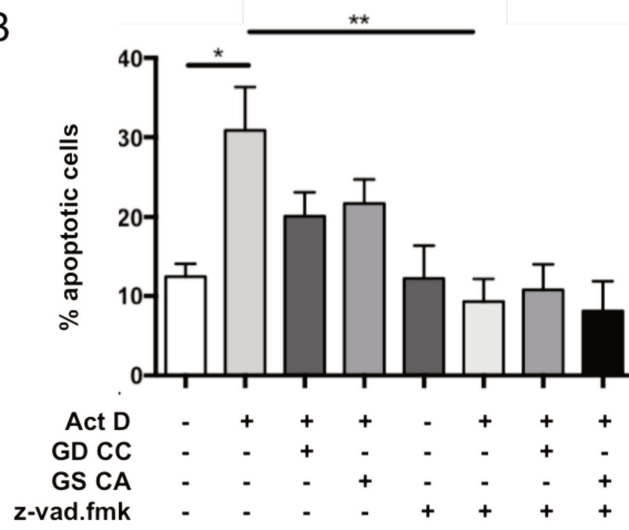
Figure Legends

Figure 1. Apple extracts protect human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) against apoptosis. Cells were incubated with medium alone or with either apple extracts (GD, GS, 10^{-2} g/L), actinomycin D (Act D, $1\mu\text{M}$), extracts and Act D, or in presence or absence of pancaspases inhibitor z-vad.fmk (z-vad, $50\ \mu\text{M}$). Quantification of PI staining of flow cytometry in non-treated cells or in presence of GD or GS (A), or after Act D treatment in presence of absence of z-vad.fmk. (C) Western blot revealing the expression of cleaved caspase 3. Data are representative of at least five independent experiments. Values represent the percentage of apoptotic cells for each treatment and are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

A



B



C

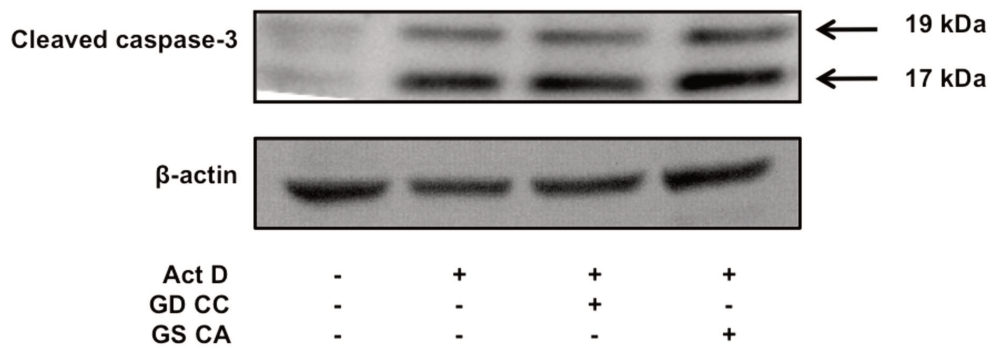
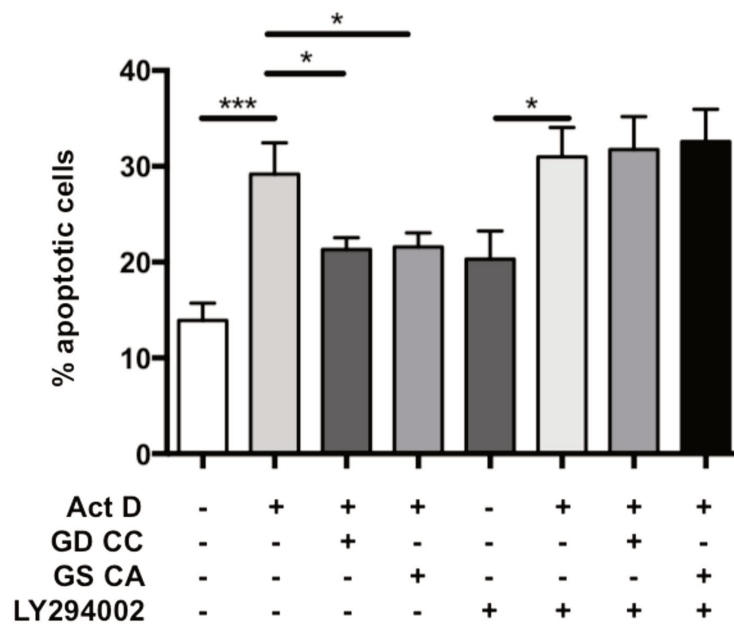


Figure 2. Effect of apple extracts is sensitive to PI3-kinase and NOS inhibitors. Cells were incubated with medium alone or with either apple extracts (GD, GS, 10^{-2} g/L), actinomycin D (Act D, $1\mu\text{M}$), extracts and Act D, or in presence or absence of PI3-kinase inhibitor LY294002 (10 mM) (A) or NOS inhibitor L-NA ($100\mu\text{M}$) (B). Quantification of PI staining of flow cytometry in non-treated cells or in presence of GD or GS, or after actD treatment in the absence or the presence of LY294002 (A) or NOS inhibitor L-NA (B). Data are representative of at least five independent experiments. Values represent the percentage of apoptotic cells for each treatment and are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

A



B

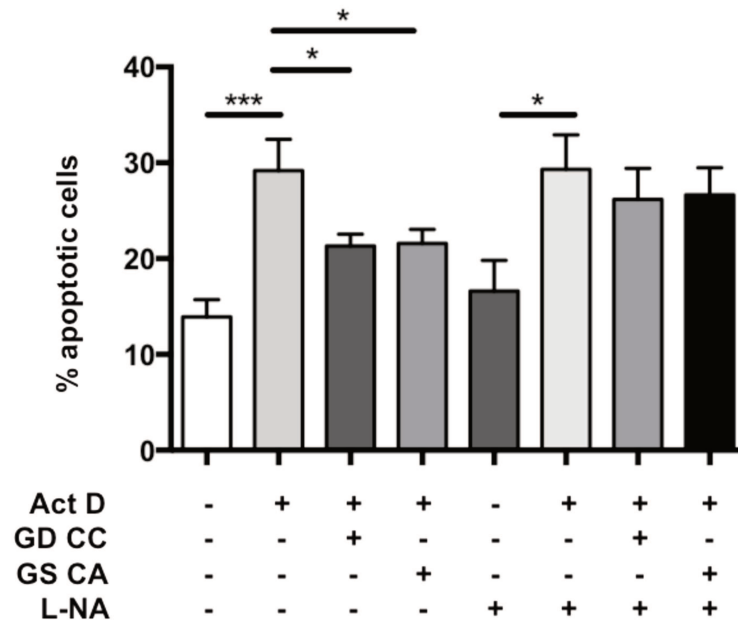
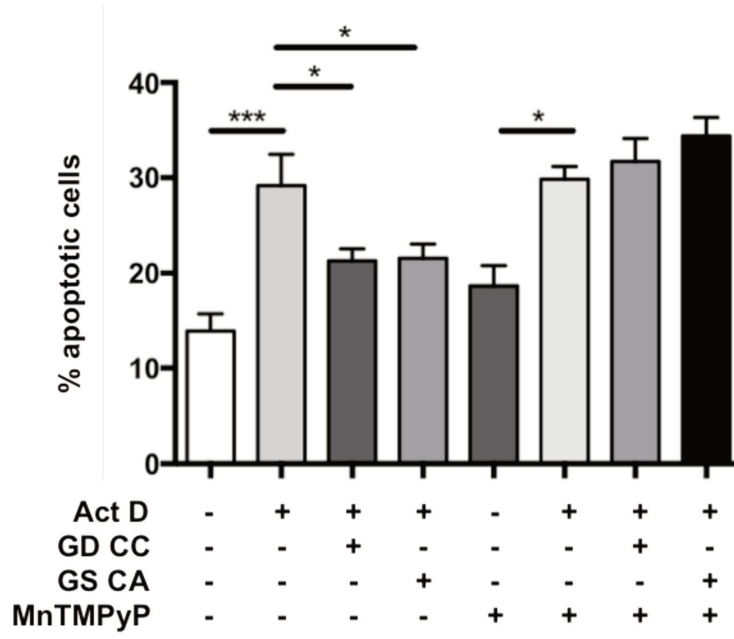


Figure 3. Effect of apple extracts is sensitive to MnTMPyP. Cells were incubated with medium alone or with either apple extracts (GD, GS, 10^{-2} g/L), actinomycin D (Act D, $1\mu\text{M}$), extracts and Act D, or in presence or absence of SOD mimetic, MnTMPyP ($100\ \mu\text{M}$) (A, B). Quantification of PI staining of flow cytometry in non-treated cells or in presence of GD or GS, or after Act D treatment in presence or absence of MnTMPyP (A). Quantification of DHE positive cells after different treatments (B). Data are representative of at least five independent experiments. Values represent the percentage of apoptotic cells for each treatment and are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

A



B

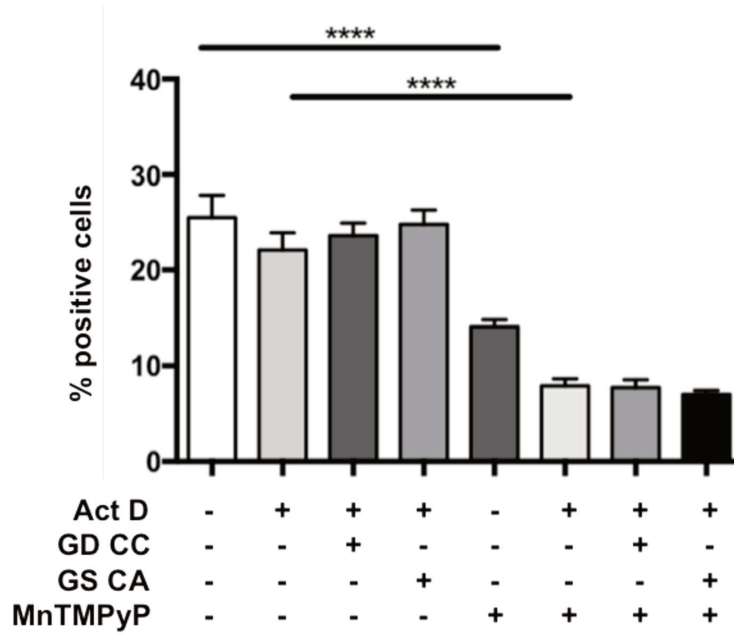
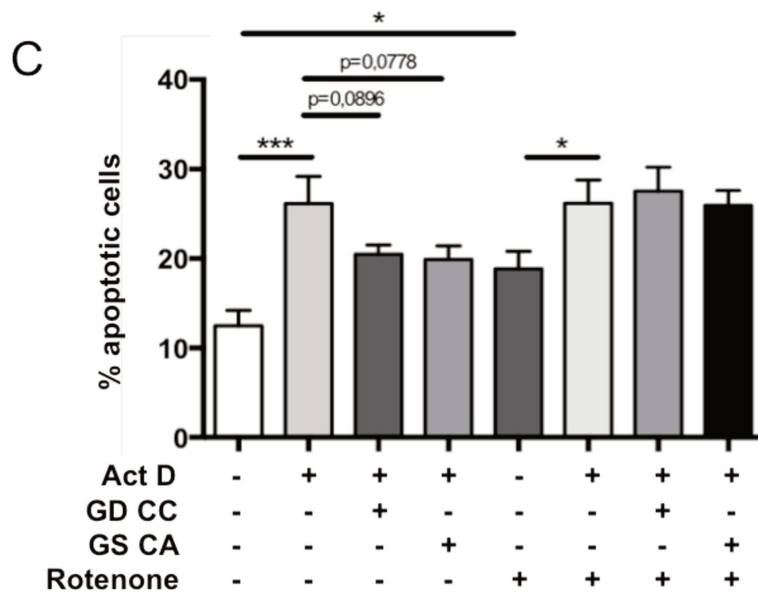
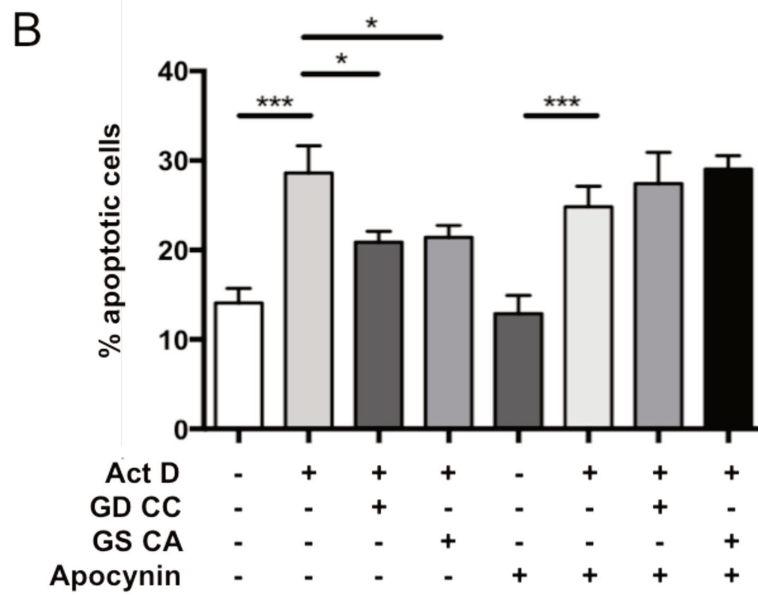
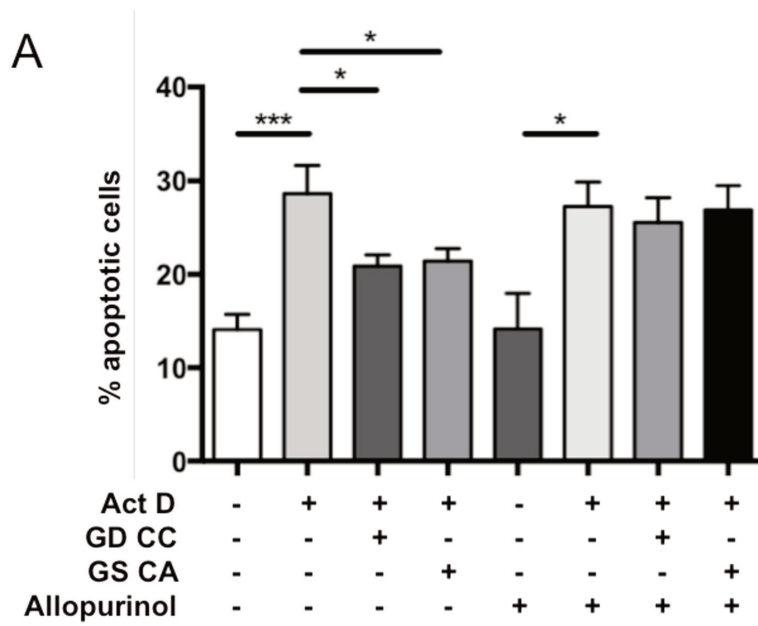


Figure 4. Effect of apple involved cytosolic and mitochondrial ROS. Cells were incubated with medium alone or with either apple extracts (GD, GS, 10^{-2} g/L), actinomycin D (Act D, 1 μ M), extracts and Act D, or in presence or absence of xanthine oxidase inhibitor, allopurinol (50 μ M) (A), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH) inhibitor, apocynin (100 μ M) (B), respiratory chain complex I inhibitor, rotenone (5 μ M) (C). Quantification of PI staining of flow cytometry in non-treated cells or in presence of GD or GS, or after actD treatment in presence or absence of allopurinol (A), apocynin (B) or rotenone (C). Data are representative of at least five independent experiments. Values represent the percentage of apoptotic cells for each treatment and are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion des résultats de l'étude

Notre premier objectif était de mettre en place un protocole expérimental nous permettant d'évaluer l'impact des conditions de culture et de conservation des échantillons et de la variabilité génétique des échantillons végétaux sur des modèles cellulaires impliqués dans l'obésité.

L'ensemble des résultats issus du criblage nous a permis de mettre en évidence un tropisme cellulaire des échantillons. Le tropisme cellulaire se définit comme la propriété d'une drogue ou d'un virus à agir de manière différente sur une cellule particulière. Pour un même échantillon, les effets observés sont différents en fonction du type cellulaire comme nous le retrouvons au niveau du test d'accumulation des lipides. Ainsi par exemple, la variété Karotan en condition Contrôle accentue le stress oxydant au niveau des adipocytes tandis qu'il l'inhibe au niveau des hépatocytes.

En ce qui concerne les pommes, nous avons étudié 4 modes de conservations : La condition Post-Récolte, la condition Froid Normalisé, la condition Atmosphère Contrôlée et la condition X-Ultra Low Oxygen. Nous constatons que les échantillons solubilisés dans l'EtOH en condition Post-Récolte inhibent la différenciation adipocytaire, au contraire des autres conditions qui n'ont aucun effet. Nous démontrons ainsi qu'il existe un impact de la condition de conservation et que, d'après les résultats obtenus par l'IRHS, il n'y a aucun effet de conservation sur la teneur en polyphénols totaux.

L'impact variétal est également démontré, notamment au niveau de l'accumulation des lipides au niveau des hépatocytes. En condition X-Ultra Low Oxygen, lorsque les échantillons sont solubilisés dans le DMSO, l'échantillon Golden Delicious accentue l'accumulation des lipides, au contraire de l'échantillon GS qui lui diminue cette accumulation. Les résultats de la transcriptomique réalisée par l'IRHS démontrent

des mécanismes spécifiques à chacune des variétés lors de la conservation au froid. Ces résultats pourraient ainsi expliquer la différence d'effet au niveau variétal. En effet, les résultats obtenus par l'IRHS ont démontré une quantité plus importante de procyanidines pour la variété GS. Ces résultats concordent avec les résultats d'une étude qui démontre le potentiel des procyanidines à limiter l'accumulation des lipides au niveau des hépatocytes *via* la diminution de l'expression de SREBP-1c (Del Bas *et al.*, 2009)

À propos des carottes, les expériences réalisées sur les pré-adipocytes ont démontré un potentiel bénéfique plus important pour la variété de carotte Blanche des Vosges. Cette variété de carotte a été sélectionnée en tant que « contrôle négatif » car elle a pour spécificité une absence de carotène dans le végétal. Ces résultats suggèrent donc que les effets observés avec la carotte Blanche des Vosges ne sont pas liés à la présence de carotène.

L'ensemble des résultats nous a permis d'établir une hiérarchisation des conditions de culture de carottes. Ainsi, la condition Stress Biotique regroupe les échantillons ayant le nombre le plus important d'effets bénéfiques. Ces effets pourraient être liés à la présence du champignon pathogène. Ce champignon ne s'attaque pas à la racine mais aux feuilles de carottes en provoquant l'apparition de tâches brunâtres. Comme tout organisme vivant, la carotte active son mécanisme de défense suite à l'intrusion d'un corps étranger *via* la production de polyphénols et de caroténoïdes. Paradoxalement, des études métaboliques réalisées par l'équipe QuarVeg, présente dans le projet INUMAMET, ont démontré que les carottes issues de la culture Stress Biotique possèdent un nombre de métabolites plus faible que celles issues d'autres conditions de culture. Une plus faible concentration en polyphénols et en caroténoïdes serait donc potentiellement plus bénéfique pour corriger les altérations liées aux pathologies associées à l'obésité. En effet, plusieurs études ont démontré l'efficacité plus importante d'une molécule lorsque sa concentration est faible. L'équipe de Baron-Menguy en 2007 a testé les effets des polyphénols de vin rouge sur la néovascularisation de souris ischémiées. Deux concentrations ont été étudiées : une faible et une forte concentration. Les résultats ont démontré que la faible concentration favorisait la néovascularisation, notamment en activant la voie

de signalisation PI3K/Akt/eNOS. Cette même concentration induisait également une augmentation de l'expression de VEGF alors que l'utilisation de la haute concentration produisait des effets totalement inverses. D'autres études ont démontré des effets quasi identiques avec le bêta-carotène (Csepanyi *et al.*, 2015).

Ces effets observés au niveau des carottes pourraient provenir des polyacétylènes (PAs). Ces PAs sont des composés phytochimiques possédant des vertus anti-inflammatoires. Or, les carottes produisent des polyacétylènes lorsqu'elles sont soumises à des infections bactériennes ou fongiques, ce qui était le cas dans notre protocole expérimental (Dawid *et al.*, 2015).

Nous avons donc démontré que l'application de ce criblage permet de nombreux effets des échantillons selon le génotype, le mode de culture et de conservation mais nous devons préciser que nous avons rencontré certaines limites pour réaliser ce criblage :

- La solubilisation semble impacter sur les résultats du criblage. En effet, les solvants que nous avons utilisés, à savoir le DMSO et l'EtOH, possèdent des propriétés polaires différentes. De ce fait, la composition de l'extraction diffère selon le solvant. Le DMSO permet la solubilisation de composés hydrophobes tandis que l'EtOH permet la solubilisation de composés hydrophiles. L'inconvénient de ce procédé est que, quel que soit le solvant utilisé, l'extraction ne contient pas la totalité des nutriments et molécules contenues dans la matière fraîche des végétaux étudiés. De plus, selon les résultats obtenus par l'IRHS, l'extrait éthanolique contient deux fois moins de composés phénoliques que l'extrait DMSO. Il serait intéressant d'utiliser une méthode de digestion enzymatique *in vitro* afin de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* (Bazzocco *et al.*, 2008). Cette méthode de solubilisation permet de mimer toutes les phases de digestion humaine, à savoir la digestion salivaire, stomacale et intestinale, respectivement. La faible durée de l'extraction (10 minutes) limite également la quantité de molécule extraites.

- L'origine des effets observés reste inconnue. Même si la composition de l'extrait est connue, il est impossible de déterminer quels sont le ou les composés responsables des effets observés ni quelle voie de signalisation est activée ou inhibée. Pour ce même protocole nous pourrions utiliser des activateurs ou inhibiteurs spécifiques des différentes voies de signalisation afin de comprendre les mécanismes d'action des échantillons.
- L'absence d'un contrôle positif ne permet pas d'évaluer de manière plus rigoureuse les effets observés lors du criblage. Une étude menée par Han *et al* a démontré que la phlorétine diminuait de manière significative l'accumulation ectopique de lipide au niveau du foie. Aussi, si nous reprenons l'exemple du test d'accumulation des lipides au niveau des hépatocytes, nous pourrions utiliser la phlorétine pour faire office de contrôle positif et ainsi évaluer les effets réels des échantillons.
- Le faible nombre de répétitions incite à nuancer les résultats obtenus (n=2). De nouvelles répétitions seront à réaliser afin de déterminer si les résultats obtenus sont bien significatifs.
- La différence de préparation des échantillons. En effet, nous n'avons pas utilisés les pommes et les carottes sous la même forme puisque les pommes étaient lyophilisées tandis que les carottes avaient été broyées. Nous avons donc un échantillon plus riche en eau pour les carottes et donc moins concentré en nutriments d'intérêt.
- Des échantillons de qualité différente. Pour la préparation des échantillons à partir des pommes, nous n'avons pris que le parenchyme sans utiliser la peau riche en polyphénols. Ceci dénote avec l'approche intégrative du projet et si nous voulons déterminer s'il existe des effets additifs ou synergiques entre les différents composants du fruits, il nous faudrait d'abord étudier la peau seule puis la peau plus le parenchyme.

L'autre partie de ce travail consistait à déterminer les voies de signalisation impliquées dans la diminution de l'apoptose induite par l'actinomycine D au niveau des cellules endothéliales.

Lors du criblage, nous avons observé que certains échantillons possédaient un fort potentiel anti-apoptotique. Il s'agissait des échantillons Golden Delicious en Froid Normalisé et la variété Granny Smith en Atmosphère Contrôlée solubilisés dans le DMSO. Les résultats de l'étude nous indiquent qu'effectivement ces échantillons sélectionnés diminuaient l'apoptose induite par l'actinomycine D de 26,5% et 29,7%, respectivement.

Un inhibiteur de caspases (zvad.fmk) a par la suite été utilisé afin de déterminer si la diminution de l'apoptose était liée à l'inhibition du clivage des caspases. Les caspases sont des protéases primordiales impliquées dans le processus apoptotique intrinsèque ou extrinsèque. Or, la mort cellulaire peut également être indépendante de la voie des caspases puisque les protéines AIF (pour apoptosis-inducing factor) et EndoG participent à la condensation de la chromatine. Ceci a pour conséquence la dégradation de l'ADN et donc, la mort cellulaire. Une étude de la morphologie cellulaire ainsi que de la dégradation de l'ADN pourrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes menant à la mort cellulaire.

Ensuite, des Western-Blot ont été réalisés afin de déterminer l'implication de la caspase-3 et de diverses protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, telles que Bax et Bcl2, respectivement. Aucune différence d'activité et d'expression au niveau de la caspase-3 clivée, Bax et Bcl2, respectivement, n'a été constatée entre les cellules traitées et les non-traitées par les échantillons. Suite aux résultats obtenus, il nous semblerait intéressant de déterminer si les échantillons permettent le recrutement des macrophages afin de stimuler l'efférocytose. En effet, l'apparition de corps cellulaires dans les tissus est plus souvent due à un défaut d'efférocytose plutôt qu'à une augmentation de l'apoptose. Or, un défaut d'efférocytose se traduit par une augmentation de l'inflammation pouvant conduire à la mort cellulaire. L'augmentation de l'efficacité de l'efférocytose pourrait conduire à une diminution de l'inflammation et donc à la diminution d'apparitions de corps apoptotiques et

nécrotiques (Thorp & Tabas, 2009).

Différents inhibiteurs ont ensuite été utilisés afin de déterminer l'implication de différentes molécules ou enzymes dans l'inhibition de cette mort cellulaire. La voie de la PI3K est impliquée dans l'activation de la eNOS ainsi que du relargage du NO qui possède un potentiel anti-apoptotique (Lee *et al.*, 2005). Les inhibiteurs LY294002 et L-NA, dirigés contre respectivement sur PI3K et NO, suppriment les effets anti-apoptotiques des échantillons. Ces résultats indiquent que les effets observés des échantillons sont liés à la voie de signalisation du NO. Pourtant, ces résultats ne nous permettent pas de déterminer à quel niveau les échantillons agissent pour diminuer l'apoptose. Différentes hypothèses peuvent être posées :

- Les échantillons augmenteraient l'activité de la PI3K. LY294002 diminue l'activité de la PI3K. L'augmentation de PI3K compenserait la diminution de l'activité de Akt, permettant ainsi l'activation de l'eNOS et donc, de la diminution de l'apoptose. Cette activation peut se faire suite à la fixation d'un ou de plusieurs composés des échantillons sur le récepteur tyrosine kinase.
- Les échantillons stimuleraient l'expression de la PI3K. L'augmentation de la production de la PI3K corrigerait les effets inhibiteurs de LY294002.
- Les échantillons stimuleraient l'activité de l'eNOS. L-NA diminue l'activité de l'eNOS. Les échantillons lèveraient cette inhibition
- Les échantillons favoriseraient l'expression de l'eNOS afin de corriger les effets inhibiteurs de la L-NA

Des Western-Blot et des RT-PCR dirigés contre PI3K et eNOS lors des mêmes protocoles expérimentaux nous permettraient de déterminer s'il existe une augmentation de l'expression et de la production d'ARNm de ces protéines, respectivement. Des Western-Blot pourraient également être dirigés au niveau des Ser¹¹⁷⁷ et Thr⁴⁹⁵ afin d'évaluer l'activité de l'eNOS.

L'apoptose induite par l'actinomycine D favorise également la production de radicaux libres. À faible concentration, ces radicaux libres participent à plusieurs

processus physiologiques (Haendeler *et al.*, 2004). Cependant, à haute concentration, les radicaux libres induisent un processus pro-inflammatoire et apoptotique. Pour nos expériences nous avons utilisé des drogues mimant les effets d'enzymes anti-oxydantes tels que la MnTMPyP et utiliser des inhibiteurs d'enzymes pro-oxydantes telles que l'apocynine. Nous voulions préciser leurs implications dans la diminution de l'apoptose lorsque les cellules étaient traitées avec les échantillons de pommes et l'actinomycine D. Les résultats obtenus montrent que la diminution de l'apoptose induite par les échantillons n'est pas retrouvée lorsque les cellules ont été traitées avec la MnTMPyP ou des inhibiteurs d'enzymes pro-oxydantes. Cependant, aucune variation n'a été observée sur la production de ROS cytosolique ou mitochondriale. Cet événement peut provenir de l'augmentation de la production de ROS au stade précoce de l'apoptose (Soleti *et al.*, 2012). Les mécanismes d'action des échantillons mettraient en jeu la modulation du stress oxydant. Une évaluation de la production de ROS au cours du temps apparaît nécessaire pour déterminer si les échantillons agissent à un niveau précoce ou non. L'utilisation de la technique de Résonance Paramagnétique Électronique permettrait d'évaluer en fonction du temps et de manière précise la quantité de ROS produites Or, la production de ROS étant nécessaire pour obtenir les effets anti-apoptotiques des échantillons, il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression et d'activités d'enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase, ou la MnSOD. Ces études permettraient en même temps de déterminer l'origine des ROS nécessaires au potentiel anti-apoptotiques des échantillons.

À l'état basal, les échantillons sélectionnés ont tendance à légèrement augmenter le stress oxydant au niveau des cellules endothéliales. Cette légère augmentation du stress oxydant induite par les échantillons de pomme pourrait être à l'origine des effets anti-apoptotiques, notamment au travers de la thioredoxine-1, enzyme anti-oxydante retrouvée dans différentes variétés de pommes (Shi *et al.*, 2014). Cette enzyme se retrouve également dans l'organisme humain. Haendeler *et al* (2004) ont démontré que la production de cette enzyme est accrue lorsque les cellules endothéliales sont exposées à une faible augmentation du stress oxydant. Cette augmentation de la production est associée à une diminution de l'activité de la

caspase-3. Or, comme dit précédemment, aucune différence de l'activité n'a été observée lors du Western-Blot. L'étude réalisée par l'équipe de Duarte a également démontré l'implication des ROS dans la vasodilatation de cellules endothéliales. Dans cette étude, les polyphénols extraits du vin rouge augmentent la production de radicaux libres favorisant la relaxation des vaisseaux *via* l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} . Cependant, cette augmentation de la production de ROS disparaît en présence d'un inhibiteur de la NADPH Oxydase, limitant ainsi le relâchement vasculaire. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec le travail réalisé pour ce projet. En effet, la présence d'un inhibiteur de radicaux libres abolit les effets anti-apoptotiques des échantillons, indiquant ainsi une possible implication des ROS dans le processus anti-apoptotique. La disparition des effets apoptotiques apparaît également en présence d'inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la production de ROS mitochondriaux.

II. Perspective de l'étude

Nous pensons que grâce aux résultats de cette étude, il pourrait être envisagé de tester les échantillons végétaux les plus efficaces sur le modèle murin. Il s'agirait d'évaluer *in vivo* les effets de ces échantillons sur le développement des pathologies associées à l'obésité (Stéatose hépatique, athérosclérose). Cette étude serait menée conjointement par le CRNH et la SFR Santé.

Ce travail de recherche a permis de renforcer les complémentarités et les compétences de chaque pôle dans leur approche nutritionnelle des maladies métaboliques associées à l'obésité et pour la prévention de l'athérosclérose. Nous avons élaboré un protocole expérimental inédit mettant en exergue une interaction génotype-environnement pouvant être déterminante dans la qualité nutritionnelle du produit ainsi que pour sa maîtrise. À terme, les résultats de notre étude pourraient participer à aiguiller les agriculteurs sur les meilleurs moyens de cultiver ou de conserver leurs produits, mais également permettre la création d'allégations nutritionnelles et de santé diffusables pour la pomme et la carotte.

Même si certaines améliorations sont à prévoir pour optimiser notre protocole de criblage, nous pensons qu'il pourrait avoir bien d'autres domaines d'application qui resteraient à définir.

CONCLUSION

Le criblage cellulaire a permis de mettre en évidence une interaction génotype-environnement sur les effets métaboliques observés sur les modèles cellulaires impliqués dans l'obésité.

RÉFÉRENCES

A. Abdal Dayem et al., The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. *Nutrients* 8, (2016).

M. A. Alam et al., Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr Metab (Lond)* 13, 27 (2016).

A. T. Ali, W. E. Hochfeld, R. Myburgh, M. S. Pepper, Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 92, 229-236 (2013).

F. Ameer, L. Scanduzzi, S. Hasnain, H. Kalbacher, N. Zaidi, De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63, 895-902 (2014).

R. Andriantsitohaina et al., Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 108, 1532-1549 (2012).

M. Aouadi et al., p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation. *FEBS Lett* 581, 5591-5596 (2007).

D. E. Arterburn, A. P. Courcoulas, Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults. *BMJ* 349, g3961 (2014).

Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi, Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord* 12, 43 (2013).

C. Baron-Menguy et al., Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *FASEB J* 21, 3511-3521 (2007).

V. Bauer, R. Sotníková, Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 29, 319-340 (2010).

S. Bazzocco, I. Mattila, S. Guyot, C. M. Renard, A. M. Aura, Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *Eur J Nutr* 47, 442-452 (2008).

A. Ben-Dor et al., Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol Cancer Ther* 4, 177-186 (2005).

C. Bouchard et al., The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322, 1477-1482 (1990).

R. C. Brownson, T. K. Boehmer, D. A. Luke, Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annu Rev Public Health* 26, 421-443 (2005).

C. Buechler, J. Wanninger, M. Neumeier, Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 17, 2801-2811 (2011).

R. Busse et al., EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23, 374-380 (2002).

B. Cannon, J. Nedergaard, Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359 (2004).

X. Castellon, V. Bogdanova, Chronic Inflammatory Diseases and Endothelial Dysfunction. *Aging Dis* 7, 81-89 (2016).

W. P. Cawthorn, J. K. Sethi, TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett* 582, 117-131 (2008).

R. Cermak, S. Wolffram, The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Curr Drug Metab* 7, 729-744 (2006).

M. V. Chakravarthy, F. W. Booth, Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* (1985) 96, 3-10 (2004).

K. L. Chambliss, P. W. Shaul, Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23, 665-686 (2002).

D. A. Chistiakov, A. N. Orekhov, Y. V. Bobryshev, Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* 6, 365 (2015).

D. T. Chu, Y. Tao, L. H. Son, D. H. Le, Cell source, differentiation, functional stimulation, and potential application of human thermogenic adipocytes in vitro. *J Physiol Biochem*, (2017).

E. Colman et al., The FDA's assessment of two drugs for chronic weight management. *N Engl J Med* 367, 1577-1579 (2012).

C. o. S. Costa et al., Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obes Surg* 21, 356-361 (2011).

E. Csepanyi et al., Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacol Res* 100, 148-156 (2015).

P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J. M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49-63 (2014).

C. Dawid, F. Dunemann, W. Schwab, T. Nothnagel, T. Hofmann, Bioactive C₁₇-Polyacetylenes in Carrots (*Daucus carota* L.): Current Knowledge and Future Perspectives. *J Agric Food Chem* 63, 9211-9222 (2015).

S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, C. García-Viguera, Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci* 11, 1679-1703 (2010).

D. Del Rio et al., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18, 1818-1892 (2013).

- A. Di Castelnuovo, S. Rotondo, L. Iacoviello, M. B. Donati, G. De Gaetano, Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 105, 2836-2844 (2002).
- R. E. Duncan, M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, H. S. Sul, Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 27, 79-101 (2007).
- G. J. Egger, N. Vogels, K. R. Westerterp, Estimating historical changes in physical activity levels. *Med J Aust* 175, 635-636 (2001).
- L. P. Erwig, P. M. Henson, Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am J Pathol* 171, 2-8 (2007).
- M. Féletou, P. M. Vanhoutte, EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)* 117, 139-155 (2009).
- S. Feng, L. Reuss, Y. Wang, Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPAR γ Expression and/or Its Transcriptional Activity. *Molecules* 21, (2016).
- A. Fernández-Sánchez et al., Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12, 3117-3132 (2011).
- M. H. Fonseca-Alaniz, J. Takada, M. I. Alonso-Vale, F. B. Lima, Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83, S192-203 (2007).
- P. Fontana, A. Zufferey, Y. Daali, J. L. Reny, Antiplatelet therapy: targeting the TxA₂ pathway. *J Cardiovasc Transl Res* 7, 29-38 (2014).
- S. Furukawa et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752-1761 (2004).
- E. A. Genné-Bacon, Thinking evolutionarily about obesity. *Yale J Biol Med* 87, 99-112 (2014).
- M. Giannotta, M. Trani, E. Dejana, VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 26, 441-454 (2013).

- I. M. Grumbach, W. Chen, S. A. Mertens, D. G. Harrison, A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J Mol Cell Cardiol* 39, 595-603 (2005).
- J. Haendeler, V. Tischler, J. Hoffmann, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 577, 427-433 (2004).
- S. I. Han et al., Estrogen receptor ligands ameliorate fatty liver through a nonclassical estrogen receptor/Liver X receptor pathway in mice. *Hepatology* 59, 1791-1802 (2014).
- E. H. Harrison, Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1821, 70-77 (2012).
- W. He et al., Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15712-15717 (2003).
- A. Helkin et al., Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg* 50, 107-118 (2016).
- Y. Higashi, T. Maruhashi, K. Noma, Y. Kihara, Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med* 24, 165-169 (2014).
- Y. Higashi, K. Noma, M. Yoshizumi, Y. Kihara, Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418 (2009).
- J. O. Hill, H. R. Wyatt, J. C. Peters, Energy balance and obesity. *Circulation* 126, 126-132 (2012).
- M. M. Ibrahim, Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11, 11-18 (2010).

W. Insull, The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 122, S3-S14 (2009).

L. L. Ji, Y. C. Sheng, Z. Y. Zheng, L. Shi, Z. T. Wang, The involvement of p62-Keap1-Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 85, 12-23 (2015).

C. D. Kay, G. Pereira-Caro, I. A. Ludwig, M. N. Clifford, A. Crozier, Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annu Rev Food Sci Technol* 8, 155-180 (2017).

T. Kelesidis, I. Kelesidis, S. Chou, C. S. Mantzoros, Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152, 93-100 (2010).

A. K. Khimji, D. C. Rockey, Endothelin--biology and disease. *Cell Signal* 22, 1615-1625 (2010).

M. A. Kluge, J. L. Fetterman, J. A. Vita, Mitochondria and endothelial function. *Circ Res* 112, 1171-1188 (2013).

M. Kobori et al., Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res* 60, 300-312 (2016).

M. Lafontan, Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S39-51 (2008).

M. Lafontan, D. Langin, Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297 (2009).

A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, R. Zechner, Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 50, 14-27 (2011).

S. Le Lay, G. Simard, M. C. Martinez, R. Andriantsitohaina, Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 908539 (2014).

J. Y. Lee et al., Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLoS One* 3, e1639 (2008).

S. J. Lee et al., Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine. *J Biol Chem* 280, 5781-5788 (2005).

H. F. Li, S. A. Chen, S. N. Wu, Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K⁺ current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 45, 1035-1045 (2000).

X. Li et al., Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in a NAFLD cell model. *Biomed Rep* 1, 71-76 (2013).

P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325 (2011).

M. F. Linton et al., Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J* 80, 2259-2268 (2016).

W. Łuczaj, E. Zapora, M. Szczepański, K. Wnuczko, E. Skrzydlewska, Polyphenols action against oxidative stress formation in endothelial cells. *Acta Pol Pharm* 66, 617-624 (2009).

S. Luo, H. Lei, H. Qin, Y. Xia, Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des* 20, 3548-3553 (2014).

R. A. Luvizotto, A. F. Nascimento, N. C. Miranda, X. D. Wang, A. L. Ferreira, Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. *Hum Exp Toxicol* 34, 612-619 (2015).

- C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747 (2004).
- M. L. Mansuri, P. Parihar, I. Solanki, M. S. Parihar, Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr* 9, 400 (2014).
- S. Martin, G. Giannone, R. Andriantsitohaina, M. C. Martinez, Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol* 139, 1095-1102 (2003).
- I. Masseau, D. K. Bowles, Carotid Endothelial VCAM-1 Is an Early Marker of Carotid Atherosclerosis and Predicts Coronary Artery Disease in Swine. *J Biomed Sci Eng* 8, 789-796 (2015).
- T. Michel, P. M. Vanhoutte, Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 459, 807-816 (2010).
- J. A. Mitchell, F. Ali, L. Bailey, L. Moreno, L. S. Harrington, Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 93, 141-147 (2008).
- M. Mudau, A. Genis, A. Lochner, H. Strijdom, Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 23, 222-231 (2012).
- A. Napolitano et al., Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *J Agric Food Chem* 52, 6526-6531 (2004).
- N. R. F. C. (NCD-RisC), Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 387, 1377-1396 (2016).
- J. M. O'Shea, N. D. Perkins, Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem Soc Trans* 36, 603-608 (2008).
- T. C. Otto, M. D. Lane, Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 229-242 (2005).

N. Ouchi, J. L. Parker, J. J. Lugus, K. Walsh, Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11, 85-97 (2011).

L. M. Oude Griep, W. M. Verschuren, D. Kromhout, M. C. Ocké, J. M. Geleijnse, Colours of fruit and vegetables and 10-year incidence of CHD. *Br J Nutr* 106, 1562-1569 (2011).

R. Padwal, A. Kezouh, M. Levine, M. Etminan, Long-term persistence with orlistat and sibutramine in a population-based cohort. *Int J Obes (Lond)* 31, 1567-1570 (2007).

A. Pérez-Pérez et al., Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 35, 71-84 (2017).

F. Perez-Vizcaino, J. Duarte, R. Andriantsitohaina, Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 40, 1054-1065 (2006).

M. Pinent et al., Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond)* 29, 934-941 (2005).

T. Rankinen, C. Bouchard, Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans. *Annu Rev Nutr* 26, 413-434 (2006).

E. Reboul, Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients* 5, 3563-3581 (2013).

M. E. Rinella, Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 313, 2263-2273 (2015).

E. D. Rosen, O. A. MacDougald, Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896 (2006).

I. Rudkowska, P. J. Jones, Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *Nutr Rev* 66, 343-348 (2008).

L. Samsell, M. Regier, C. Walton, L. Cottrell, Importance of android/gynoid fat ratio in predicting metabolic and cardiovascular disease risk in normal weight as well as overweight and obese children. *J Obes* 2014, 846578 (2014).

H. A. Seo, I. K. Lee, The role of Nrf2: adipocyte differentiation, obesity, and insulin resistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 184598 (2013).

A. Shehzad, W. Iqbal, O. Shehzad, Y. S. Lee, Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)* 11, 8-20 (2012).

T. Shen, X. N. Wang, H. X. Lou, Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep* 26, 916-935 (2009).

Y. Shi, L. Jiang, L. Zhang, R. Kang, Z. Yu, Dynamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage. *Hortic Res* 1, 6 (2014).

R. Siersbaek, R. Nielsen, S. Mandrup, PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett* 584, 3242-3249 (2010).

T. Skurk, C. Alberti-Huber, C. Herder, H. Hauner, Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1023-1033 (2007).

J. Slavin, Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417-1435 (2013).

S. R. Smith et al., Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *N Engl J Med* 363, 245-256 (2010).

R. Soleti, E. Lauret, R. Andriantsitohaina, M. Carmen Martínez, Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 53, 2159-2170 (2012).

- G. Spanier et al., Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4, 111-116 (2009).
- C. S. Stancu, L. Toma, A. V. Sima, Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 349, 433-446 (2012).
- J. Stitham, C. Midgett, K. A. Martin, J. Hwa, Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol* 2, 24 (2011).
- K. Sun, C. M. Kusminski, P. E. Scherer, Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121, 2094-2101 (2011).
- I. Tabas, G. García-Cardeña, G. K. Owens, Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 209, 13-22 (2015).
- S. W. Tait, D. R. Green, Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452-6461 (2008).
- E. Thorp, I. Tabas, Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 86, 1089-1095 (2009).
- P. Tontonoz, B. M. Spiegelman, Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77, 289-312 (2008).
- D. Tousoulis, A. M. Kampoli, C. Tentolouris, N. Papageorgiou, C. Stefanadis, The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10, 4-18 (2012).
- Y. Toyoshima et al., Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology* 146, 4024-4035 (2005).
- N. R. Tykocki, S. W. Watts, The interdependence of endothelin-1 and calcium: a review. *Clin Sci (Lond)* 119, 361-372 (2010).
- M. R. Vafa et al., Effects of apple consumption on lipid profile of hyperlipidemic and overweight men. *Int J Prev Med* 2, 94-100 (2011).

M. R. Vafa et al., Effects of apple consumption on lipid profile of hyperlipidemic and overweight men. *Int J Prev Med* 2, 94-100 (2011).

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

E. A. Van Vré, H. Ait-Oufella, A. Tedgui, Z. Mallat, Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 887-893 (2012).

E. C. Villanueva, M. G. Myers, Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S8-12 (2008).

S. Voutilainen, T. Nurmi, J. Mursu, T. H. Rissanen, Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 83, 1265-1271 (2006).

A. Wree, L. Broderick, A. Canbay, H. M. Hoffman, A. E. Feldstein, From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 627-636 (2013).

J. Xu, X. Lu, G. P. Shi, Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci* 16, 11574-11608 (2015).

M. Yamaguchi, C. A. Baile, S. Zhu, M. Shoji, Bioactive flavonoid p-hydroxycinnamic acid stimulates osteoblastogenesis and suppresses adipogenesis in bone marrow culture. *Cell Tissue Res* 354, 743-750 (2013).

T. Yamauchi, T. Kadowaki, Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S13-18 (2008).

G. Yan, B. You, S. P. Chen, J. K. Liao, J. Sun, Tumor necrosis factor- α downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1- α 1. *Circ Res* 103, 591-597 (2008).

J. Y. Yang et al., Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* 82, 1032-1039 (2008).

R. J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59 (2008).

R. Zechner et al., FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* 15, 279-291 (2012).

Y. Zhou, L. Rui, Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med* 7, 207-222 (2013).

C. Zihni, C. Mills, K. Matter, M. S. Balda, Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 564-580 (2016)

Thèse de Doctorat

Mehdi FRIFRA

Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques : Caractérisation des échantillons végétaux sur des modèles cellulaires impliqués dans l'obésité

Impact of nutrients on metabolic diseases : characterization of vegetal samples
on cellular models involved in obesity

Résumé

L'obésité est la pathologie métabolique la plus répandue dans le monde, induisant le développement de maladies telles que la stéatose hépatique non-alcoolique et l'athérosclérose. L'approche nutritionnelle apparaît primordiale dans la prévention de ces désordres métaboliques. Des études ont démontré une relation inverse entre la consommation de végétaux et le développement de maladies métaboliques. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des conditions de culture et de conservation couplé à la variabilité génétique de deux végétaux (pommes et carottes) sur des modèles cellulaires dont la fonction est altérée lors de l'obésité (hépatocytes et adipocytes). Quatre variétés de pommes (Gala, Golden Delicious, Granny Smith et Pink Lady) ont été stockées selon quatre modes de conservation tandis que six variétés de carottes (Karotan, Bolero, Presto, Deep Purple, Kintoki et Blanche des Vosges) ont été cultivées selon quatre méthodes différentes. La stratégie de ce projet consiste en une mise en place de protocoles adéquats pour le criblage cellulaire dans différents processus métaboliques tels que l'apoptose, l'accumulation des lipides et le stress oxydant. Le criblage cellulaire a démontré une variabilité des effets des échantillons dépendant de la conservation, de la culture et de la variabilité génétique. Ces résultats ont permis de les classer en fonction de leurs effets bénéfiques. Les deux échantillons de pommes ayant le plus haut potentiel anti-apoptotique sur les cellules endothéliales ont été choisis afin de déterminer leurs mécanismes d'actions. Les résultats montrent que le mécanisme d'action de ces échantillons met en jeu la modulation du stress oxydant.

Mots clés

Obésité, Maladies Métaboliques, Criblage cellulaire, Stress oxydant, Accumulation des lipides, Apoptose

Abstract

Obesity is a metabolic disorder that is spreading worldwide. Obesity can lead to many diseases such as non-alcoholic fatty liver disease or atherosclerosis. Nutritional approach appears to be an essential strategy for the prevention of metabolic disorders. Indeed, some studies show the correlation between vegetables' consumption and decrease of cardiovascular diseases. The aim of the study is to evaluate the impact of harvests and storages' conditions coupled with genetic variability of two vegetables (apples and carrots) on cellular models in which their function is altered during obesity (hepatocytes and adipocytes). Four varieties of apple (Gala, Golden Delicious, Granny Smith and Pink Lady) have been used depending on four different types of storage whereas six varieties of carrots (Karotan, Bolero, Presto, Deep Purple, Kintoki and Blanche des Vosges) have been harvested in four different ways. The strategy of this project is to put some proper protocols for cellular screening in different metabolic processes such as apoptosis, adipocyte differentiation, lipid accumulation, and oxidative stress. Cellular screening showed variabilities on samples effects depending on storage and harvest conditions, and genetic variabilities. These results allowed us to classify samples according to their most interesting beneficial effects. Then, we chose apple samples with the highest anti-apoptotic effects on endothelial cells in order to investigate their mechanisms of action. The results show that the ability of apple samples to reduce apoptosis is associated with the modulation of oxidative stress.

Key Words

Obesity, Metabolic diseases, Cellular screening, Oxidative stress, Lipid accumulation, Apoptosis